

**Analyse der Evolution und Funktion von
Globinen in Arthropoden**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

**Andreas Prothmann
geb. am 10.03.1982 in Frankfurt am Main**

Mainz, September 2019

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Die Proteinfamilie der Globine: strukturelle Gemeinsamkeiten und funktionelle Diversifikation	1
1.2	Globine in Arthropoden	5
1.3	Die Globin-Familie von <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellsystem.....	7
1.4	Ziele dieser Arbeit	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Fliegenhaltung und Methoden zur phänotypischen Analyse	12
2.1.1	Fliegenhaltung.....	12
2.1.2	Fliegenstämme	12
2.1.3	Modulation von Sauerstoff-Bedingungen.....	13
2.1.4	Ermittlung der Lebensdauer von <i>Drosophila melanogaster</i> unter Normoxie.....	14
2.1.5	Ermittlung der Lebensdauer von <i>Drosophila melanogaster</i> unter Hyperoxie	14
2.1.6	Ermittlung der Toleranz von <i>Drosophila melanogaster</i> gegenüber Hypoxie	14
2.1.7	Fertilitätstest	15
2.1.8	Präparation von Testes aus <i>Drosophila</i> -Männchen.....	15
2.1.9	Phasenkontrastmikroskopie von <i>Drosophila</i> -Testes	15
2.1.10	Ermittlung der Spermien-Viabilität	15
2.1.11	Statistische Auswertung.....	16

2.2	Molekularbiologische Methoden.....	16
2.2.1	Präparation von genomischer DNA aus <i>Drosophila melanogaster</i>	16
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.2.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	17
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	18
2.2.5	DNA-Fällung mit Ethanol.....	18
2.2.6	Ligation von PCR-Produkten in Klonierungsvektoren.....	19
2.2.7	Transformation durch Elektroporation.....	19
2.2.8	Übernacht-Kultur und Plasmidpräparation	19
2.2.9	DNA-Sequenzierung.....	20
2.2.10	RNA-Isolierung aus <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.2.11	Natriumacetat-Fällung von RNA-Proben	20
2.2.12	cDNA-Synthese.....	21
2.2.13	Quantitative Realtime Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR)	21
2.3	Proteinbiochemische Methoden	22
2.3.1	Herstellung von Antikörpern.....	22
2.3.2	Proteinextraktion aus <i>Drosophila melanogaster</i>	23
2.3.3	Proteinquantifizierung	23
2.3.4	SDS-PAGE (Sodiumdodecyl-Polyacrylamidgelelektrophorese).....	24
2.3.5	Western-Blot.....	25
2.3.6	Antikörper-Bindung und ECL-Nachweis.....	25
2.3.7	Strippen von Nitrocellulose-Membranen	26
2.3.8	Relative Quantifizierung der Proteinexpression durch Western-Blot.....	26
2.3.9	Subzelluläre Fraktionierung	26
2.3.10	Immunfluoreszenz an <i>Drosophila</i> -Testes.....	27

2.4	Generierung von Fliegen mit genetischem Knockout von Glob1.....	28
2.4.1	Suche nach geeigneten Zielsequenzen für die Cas9-Endonuklease.....	28
2.4.2	Herstellung des gRNA-Plasmids.....	29
2.4.3	Transformation des gRNA-Plasmids in die Keimbahn von <i>Drosophila</i> - Embryonen.....	31
2.4.4	Generierung stabiler Stämme mit homozygoter Mutation von Glob1.....	32
3	Ergebnisse	36
3.1	The globin gene family in arthropods: evolution and functional diversity	36
3.2	Funktionelle Analyse der Globine in <i>Drosophila melanogaster</i>	75
3.2.1	Analyse der Testes-spezifischen Proteine Glob2 und Glob3	75
3.2.2	Charakterisierung von Fliegen mit erhöhter Expression von Glob2 und Glob3.....	79
3.2.3	Charakterisierung von Fliegen mit transkriptionellem Knockdown von Glob3.....	89
3.2.4	Generierung von Fliegen mit genetischem Knockout von Glob1 mittels CRISPR/Cas9.....	101
4	Diskussion und Ausblick	105
4.1	Die Globine der Arthropoden: mindestens vier ancestrale Linien	105
4.2	Acylierte Globine und ihre weite Verbreitung in Tieren	107
4.2.1	GbX und GbXL: zwei verwandte, konservierte Globine mit potentieller Acylierung.....	107
4.2.2	Acylierungen auch bei HbL der Arthropoden	109
4.2.3	Welche Funktionen haben GbX und GbXL?	111

4.3	Glob2 und Glob3 bei <i>Drosophila melanogaster</i> : Genduplikate mit divergierenden Funktionen in der Spermatogenese	116
4.4	Funktionsanalyse des Glob1 von <i>Drosophila melanogaster</i>	120
4.4.1	Gen-Knockout durch CRISPR/Cas9: Effizienz vs. Spezifität.....	120
4.4.2	Das Ziel: Phänotypische Analyse des Glob1-Knockouts	124
5	Zusammenfassung.....	126
6	Literatur	128
7	Anhang.....	142
7.1	Abkürzungsverzeichnis	142
7.2	Abbildungsverzeichnis	144
7.3	Tabellenverzeichnis.....	145
7.4	Elektronischer Anhang.....	146
8	Danksagung.....	147
9	Eidesstattliche Erklärung	148
10	Lebenslauf	149

1 Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Globine: strukturelle Gemeinsamkeiten und funktionelle Diversifikation

Globine sind die phylogenetisch am weitesten verbreitete Familie gasbindender Proteine und sind im gesamten Stammbaum des Lebens vertreten. Bereits Archaeen und Bakterien besitzen eine Reihe diverser Globingene in ihrem Genom (Vinogradov et al. 2013b). Vermutlich durch horizontalen Gentransfer gelangten Globingene während endosymbiotischer Ereignisse auch in das Genom ursprünglicher Eukaryoten (Vinogradov et al. 2007). Hier durchliefen die Globine eine durch zahlreiche Duplikationsereignisse geprägte Evolution und sind meist in mehreren Genkopien in Pilzen (Vinogradov et al. 2013a), Algen (Johnson und Lecomte 2015), Pflanzen (Vazquez-Limon et al. 2012) und Tieren (Burmester und Hankeln 2014) zu finden.

Globine haben in der Regel eine etwa 150 Aminosäure lange Kernsequenz, die aber in einigen Fällen durch N- oder C-terminale Extensionen erweitert ist. Obwohl sich die Aminosäuresequenzen von Globinen teilweise sehr stark unterscheiden, ist ihre Tertiärstruktur („globin fold“) sehr konserviert. Die typische Globinfaltung besteht aus acht α -Helices (A-H), die eine drei-über-drei Sandwich-Struktur einnehmen (Kendrew et al. 1958; Dickerson und Geis 1983). Die Helices bilden dabei eine funktionelle hydrophobe Tasche, in der sich die Häm-Gruppe befindet (Abbildung 1-1A). Durch diese prosthetische Gruppe, die ein Fe^{2+} -Ion beinhaltet, sind Globine in der Lage O_2 oder in einigen Fällen auch andere gasförmige Liganden wie NO oder CO reversibel zu binden (Perutz 1979; Bolognesi et al. 1997). Dabei wird das Häm innerhalb des Globins durch ein konserviertes Phenylalanin an Position CD1 (die erste Position zwischen den Helices C und D) fixiert. Das Fe^{2+} -Ion ist wiederum durch vier Stickstoffatome des Protoporphyrinrings sowie durch das sogenannte „proximale“ Histidin des Globins an Position F8 koordiniert. An das Fe^{2+} -Ion kann ein externer Ligand gebunden werden, der wiederum durch das „distale“ Histidin an Position E7 stabilisiert wird (Abbildung 1-1B). Man unterscheidet hier zwischen penta- und hexakoordinierten Globinen. Während bei pentakoordinierten Globinen im deoxygenierten Zustand die sechste Koordinationsstelle des Fe^{2+} -Ions frei zur Bindung von Liganden vorliegt, ist diese bei hexakoordinierten Globinen zunächst durch das distale Histidin HisE7 besetzt (Kakar et al.

2010). Mögliche Liganden konkurrieren hier mit dem HisF7 und müssen dieses zunächst verdrängen, bevor sie an das Globin binden können (Abbildung 1-1C). Die höhere O₂-Affinität pentakoordinierter Globine spricht eher für eine Funktion dieser Globine im Transport von Sauerstoff oder der Detoxifizierung von ROS oder NO, während hexakoordinierte Globine möglicherweise an der Signaltransduktion beteiligt sein könnten (Smagghe et al. 2009). Sowohl bei penta-, als auch bei hexakoordinierten Globinen sind die für die Häm- und Ligandenbindung funktionell wichtigen Aminosäuren in der Globinsequenz stark konserviert. Bei einigen Globinen ist das distale Histidin durch ein Glutamin ersetzt, ansonsten besitzen nahezu alle Globine die Aminosäuren HisE7, HisF8, und PheCD1.

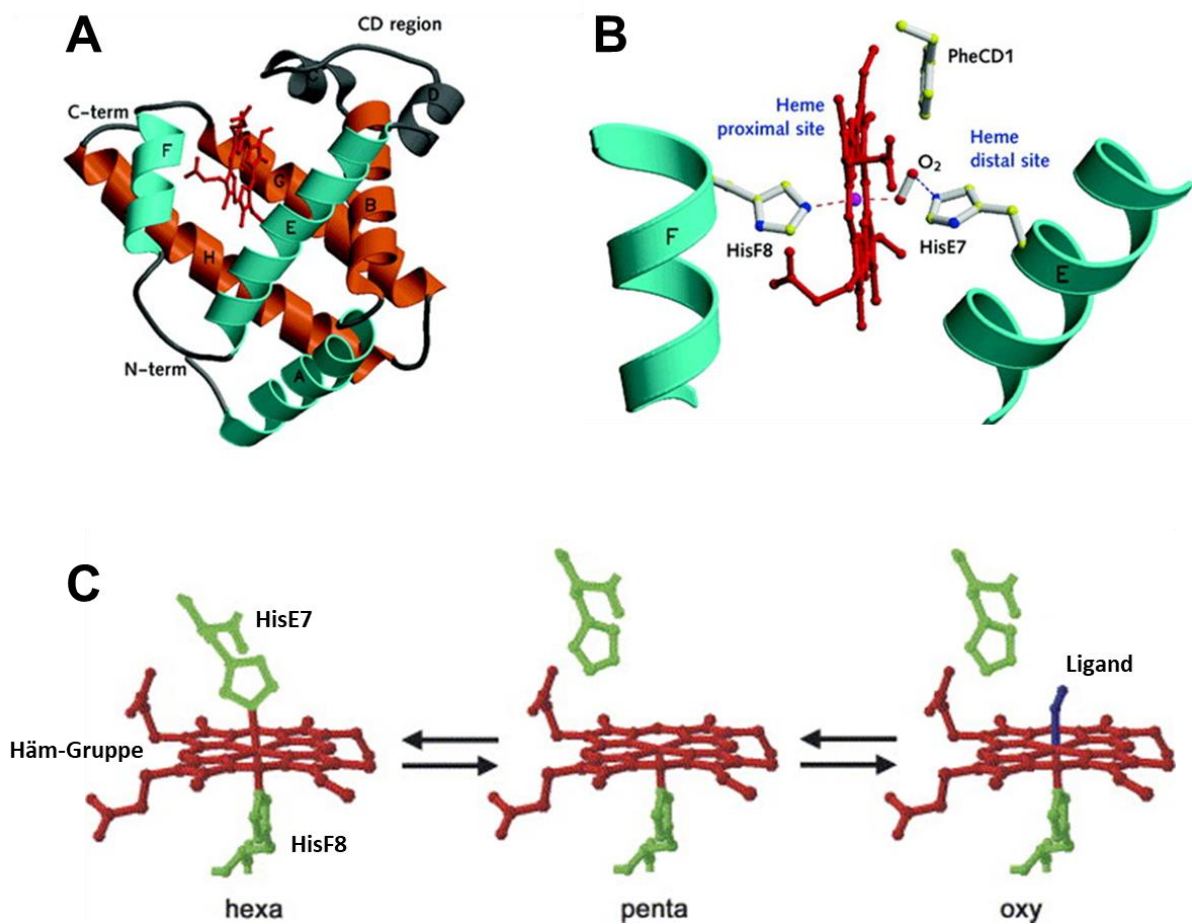


Abbildung 1-1. Darstellung der Globin-Struktur. A: Die Helices A-H bilden die klassische drei-über-drei Sandwich-Struktur. Darin befindet sich die Häm-Gruppe (rot). B: Bindung des Häm durch die funktionell wichtigen Aminosäuren PheCD1, HisF8 und HisE7 im oxygenierten Zustand. C: Schematische Darstellung der Koordinationsformen eines hexakoordinierten Globins. Das im hexakoordinierten Zustand an das Fe-Atom gebundene proximale HisE7 muss zunächst entfernt werden. Erst in diesem pentakoordinierten Zustand kann ein externer Ligand gebunden werden (verändert nach Pesce et al. 2002; Hankeln et al. 2005).

Ähnlich der Proteinfaltung ist auch die Genstruktur der Globine stark konserviert. Die meisten Globingene bestehen aus drei Exons und besitzen zwei Introns an den Positionen B12.2 (zwischen den Codonpositionen 2 und 3 der 12. Aminosäure der B-Helix) und G7.0. Diese zwei ancestralen Intronpositionen findet man in den Globinen vieler Tiere und sogar auch Pflanzen (Dixon und Pohajdak 1992; Hardison 1996). Ein zusätzliches Intron befindet sich außerdem häufig an variablen Position der E-Helix. Die mögliche funktionelle Relevanz der Konservierung von Intronpositionen in Globingenen ist bislang nicht erforscht.

Strukturell und funktionell am besten untersucht sind die Globine der Vertebraten. Jahrzehntlang waren hier nur das Hämoglobin (Hb) und das Myoglobin (Mb) mit ihren respiratorischen Funktionen beim Transport bzw. der Speicherung von Sauerstoff bekannt (Wittenberg 1970; Perutz 1979; Dickerson und Geis 1983). Im Zuge der Erkenntnisse der Genomforschung wurden in der Genfamilie der Globine bei Vertebraten einige zuvor unbekannte Vertreter identifiziert. Dies sind das Neuroglobin (Ngb) (Burmester et al. 2000), Cytoglobin (Cygb) (Kawada et al. 2001; Burmester et al. 2002; Trent und Hargrove 2002), GlobinX (GbX) (Roesner et al. 2005), GlobinY (GbY) (Fuchs et al. 2006) und GlobinE (GbE) (Kugelstadt et al. 2004). Neben diesen Globinen, die allesamt aus einer einzelnen Globindomäne bestehen, wurde mit Androglobin (Adgb) ein großes chimäres Protein entdeckt, das eine rearrangierte Globindomäne, fusioniert mit einer N-terminalen Calpain-domäne und einem Calmodulin-Bindemotiv, besitzt (Hoogewijs et al. 2012).

Betrachtet man die Globine der Vertebraten in Zusammenhang mit Globinen anderer Deuterostomier und auch Protostomier, so kann man in phylogenetischen Analysen vier vermutlich ancestrale Hauptgruppen der Globinfamilie bei Metazoen identifizieren: die Ngb-Linie, die GbX-Linie, eine GlobinX-ähnliche Linie (GlobinX-Like; GbXL) und eine Linie mit diversifizierten Ein-Domän-Globinen (inklusive der Vertebraten-spezifischen Globine Hb, Mb, Cygb, GbY und GbE), die vereinfachend und ohne funktionelle Konnotation als Hämoglobin-ähnlich (Hemoglobin-Like; HbL) bezeichnet werden können (Blank und Burmester 2012; Hoffmann et al. 2012). Hinzu kommt als fünfte ancestrale Linie das Adgb, dessen relative Stellung im Stammbaum aber unklar ist (Hoogewijs et al. 2012) (Abbildung 1-2).

Mit der wachsenden Anzahl bekannter Globine wuchs auch die Anzahl möglicher Funktionen dieser Proteine, die über die „klassischen“ respiratorischen Funktionen hinausgehen. Globine könnten demnach u.a. am Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), am NO-Metabolismus

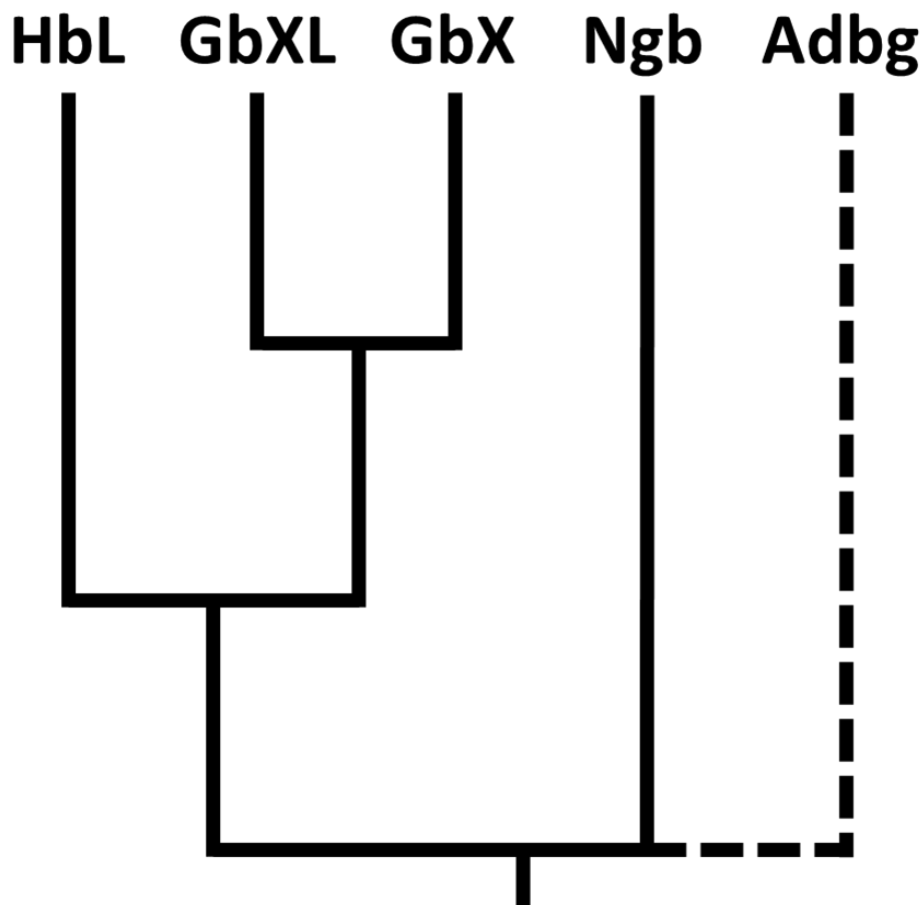


Abbildung 1-2. Phylogenie der ursprünglichen eindomänigen Globintypen der Metazoa. Die relative Position des ebenfalls ancestralen, jedoch aus mehreren Domänen zusammengesetzten Adbg ist unklar.

oder auf verschiedene Weise an der Signaltransduktion beteiligt sein (Reviews: Vinogradov und Moens 2008; Burmester und Hankeln 2014) (Abbildung 1-3). Bemerkenswert im funktionellen Zusammenhang ist, dass die Proteinsequenzen einiger Globine Motive für N-terminale Acylierungen aufweisen, die auf eine Membranbindung schließen lassen. Dies könnte für eine membranassoziierte Signalfunktion dieser Globine sprechen (Blank und Burmester 2012). Bei den postulierten möglichen Funktionen von Globinen handelt es sich allerdings zumeist um *in vitro*-Funktionshypothesen, die entsprechenden *in vivo*-Beweise stehen dagegen oft noch aus. Die genauen Funktionen der meisten Globine sind daher weiterhin unbekannt.

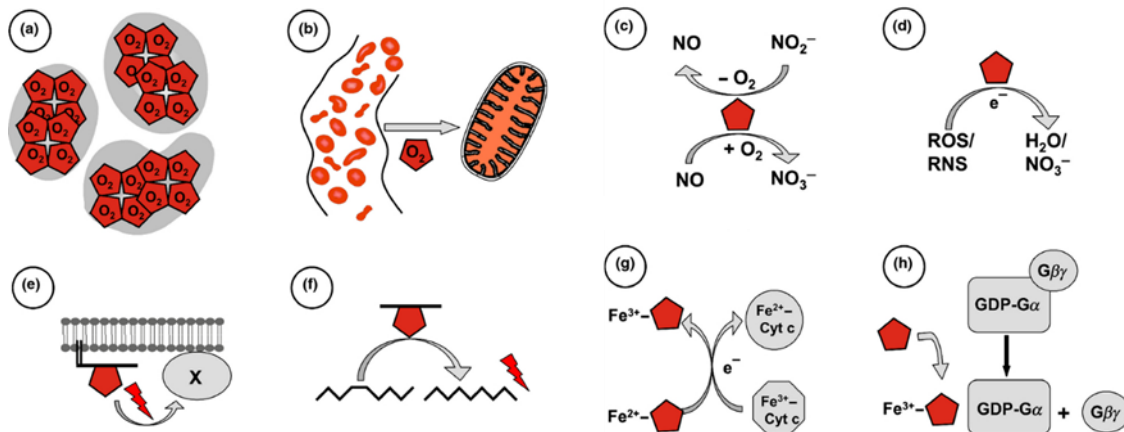


Abbildung 1-3. Mögliche Funktionen von Globinen. (a) Transport von O₂ im Blut; (b) Intrazellulärer Transport von O₂ zu den Mitochondrien; (c) Entgiftung von NO zu NO₃⁻, bzw. Produktion von NO als Signalmolekül aus NO₂⁻; (d) Entgiftung von reaktiven Sauerstoff-, bzw. Stickstoffspezies; (e) Beteiligung membrangebundener Globine an Signaltransduktion; (f) Auslösen von Lipid-basierten Signalwegen; (g) Reduktion von Cytochrom-C zur Verhinderung von Hypoxie-induzierter Apoptose; (h) Signalfunktion durch Interaktion mit GDP-Gα. (Burmester und Hankeln 2014)

1.2 Globine in Arthropoden

Dass Globine auch in der sehr artenreichen und vielfältigen Gruppe der Arthropoden vorkommen, ist seit langer Zeit bekannt. Die auffallend rote Färbung der im Wasser lebenden Larven von Zuckmücken der Gattung *Chironomus* konnte bereits im 19. Jahrhundert auf die Präsenz von Hämoglobin zurückgeführt werden (Rollett 1861; Lankester 1872). *Chironomus* besitzt gar über 40 verschiedene Globingene (Kao et al. 1995; Trewitt et al. 1995; Hankeln et al. 1998), deren Proteine hauptsächlich in der Hämolymphe der Larven am O₂-Transport beteiligt sind und ein Überleben in O₂-armen Gewässern ermöglicht (Weber und Vinogradov 2001). Weitere Arthropodenglobine wurden in den Larven der ebenfalls zu den Dipteren gehörenden Pferdemenigenbremse *Gasterophilus intestinalis* (Keilin und Wang 1946), in aquatisch lebenden Hemipteren wie dem Rückenschwimmern *Buena* (Hungerford 1922) sowie außerhalb der Insekten in einigen Crustaceen wie beispielsweise den Wasserflöhen der Gattung *Daphnia* (Fox et al. 1951) beschrieben. All diese Tiere haben gemeinsam, dass sie zumindest in manchen Entwicklungsstadien unter hypoxischen Bedingungen leben. Die starke Expression der Globine, die in den zitierten Fällen zu einer charakteristischen roten Färbung der Tiere führt (Abbildung 1-4), ist daher höchstwahrscheinlich auf eine wichtige Beteiligung

der Globine an der Versorgung mit Sauerstoff zurückzuführen (Dewilde et al. 1998; Zeis et al. 2003; Matthews und Seymour 2006; Wawrowski et al. 2012).

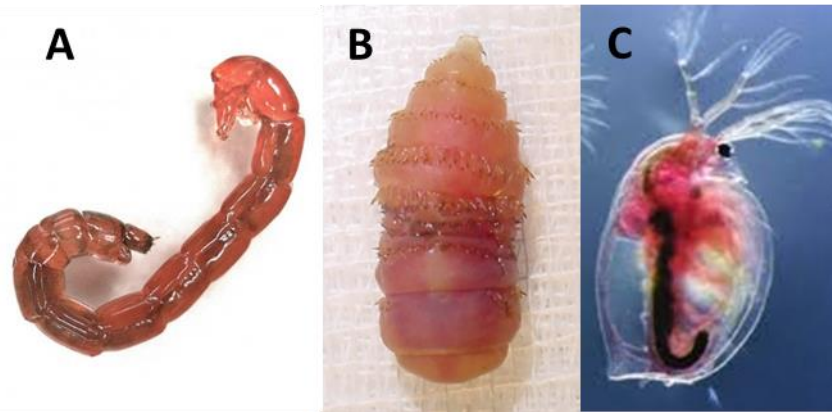


Abbildung 1-4. Arthropoden mit roter Färbung aufgrund starker Globin-Expression. A: Larve der Zuckmücke; B: Larve der Pferdemenigenbremse; C: adulter Wasserfloh. (A und B: Wikipedia.org; C: Colbourne et al. 2011)

Ungeachtet der oben aufgeführten Beispiele wurde die Präsenz von Globinen in Arthropoden lange Zeit vornehmlich als Ausnahme und Einzelfall aufgefasst. Aufgrund der verbreiteten und sehr effizienten Tracheenatmung wurde angenommen, dass die meisten Arthropoden keine Globine als Atmungsproteine benötigen. Dies änderte sich mit der überraschenden Entdeckung eines klassischen Globins in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Burmester und Hankeln 1999). In den folgenden Jahren konnten neben zwei weiteren Globinen in der Fruchtfliege (Burmester et al. 2006) bisher unbekannte Globine auch in einer Reihe weiterer Insekten identifiziert werden, die nicht in einer sauerstoffarmen Umgebung leben (Burmester und Hankeln 2007). Neben weiteren Dipteren und Hemipteren, wie der Fliege *Glossina morsitans*, den Mücken *Anopheles gambiae* und *Aedes aegypti* sowie den Blattläusen *Acythosiphon pisum* und *Aphis gossypii*, befanden sich darunter auch Vertreter anderer Gattungen, wie die Honigbiene *Apis mellifera*, die Käfer *Dascillus cervinus* und *Tribolium castaneum* sowie einige Schmetterlinge (Hankeln et al. 2006; Burmester et al. 2007; Kawaoka et al. 2009). Die für die Bindung von Sauerstoff wichtigen Aminosäuren erwiesen sich bei all diesen Globinen als stark konserviert, was dafür spricht, dass es sich tatsächlich um funktionelle O₂-bindende Proteine handelt (Burmester und Hankeln 2007). Während die meisten dieser Globine der Linie der HbL-Varianten zuzuordnen sind, konnten vereinzelt auch

Globine in Arthropoden identifiziert werden, bei denen es sich um Vertreter der GbX- und GbXL-Linie handelt (Dröge und Makalowski 2011; Blank und Burmester 2012). All dies zeigt, dass Globine viel häufiger in Arthropoden vorkommen als zunächst angenommen und womöglich zum Standard-Genrepertoire der Arthropoden gehören. Ein umfassender Überblick über die Gesamtheit der in Arthropoden vorkommenden Globine sowie deren Diversität und Evolution fehlt aber bislang.

1.3 Die Globin-Familie von *Drosophila melanogaster* als Modellsystem

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* besitzt in ihrem Genom die Gene für drei verschiedene Globine: Glob1, Glob2 und Glob3. Trotz einer Reihe publizierter funktioneller Analysen sind die genauen physiologischen Funktionen der *Drosophila*-Globine weitgehend unverstanden.

Das Glob1 von *Drosophila melanogaster* besteht aus 153 Aminosäuren und weist eine sehr typische Globinstruktur mit einer Domäne auf. Glob1 ist ein hexakoordiniertes Globin, die sechste Koordinationsstelle des Fe²⁺-Ions ist somit im deoxygenierten Zustand durch das distale Histidin E7 besetzt (Hankeln et al. 2002; de Sanctis et al. 2005). Die zugrundeliegende Genstruktur des kodierenden Bereiches setzt sich aus drei Exons und zwei Introns zusammen. Neben einem Globin-typischen Intron an Position G7.0 befindet sich das andere Intron allerdings an der ungewöhnlichen Position D7.0 (Burmester und Hankeln 1999). Die gleichen Intronpositionen finden sich auch im Globin von *Gasterophilus intestinalis* (Dewilde et al. 1998), was für eine evolutionäre und möglicherweise funktionelle Verwandtschaft beider Globine spricht. Glob1 wird mRNA in-situ-Hybridisierungen zufolge in allen Entwicklungsstadien und hauptsächlich in den Tracheen und im metabolisch sehr aktiven Fettkörper exprimiert (Hankeln et al. 2002; Abbildung 1-5). Bereits dies könnte auf eine Funktion als Atmungsprotein hindeuten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass seine Expression abhängig vom Sauerstoffgehalt der Umgebung reguliert ist. Entgegen dem Muster klassischer Sauerstofftransportproteine kommt es allerdings unter Hypoxie zu einer vermutlich durch den Transkriptionsfaktor HIF (hypoxia inducible factor) vermittelten verminderten Expression von Glob1 (Gorr et al. 2004; Gleixner et al. 2008). Eine hyperoxische Umgebung führt dagegen zu einer verstärkten Expression von Glob1 (Gleixner et al. 2008). Möglicherweise handelt es sich

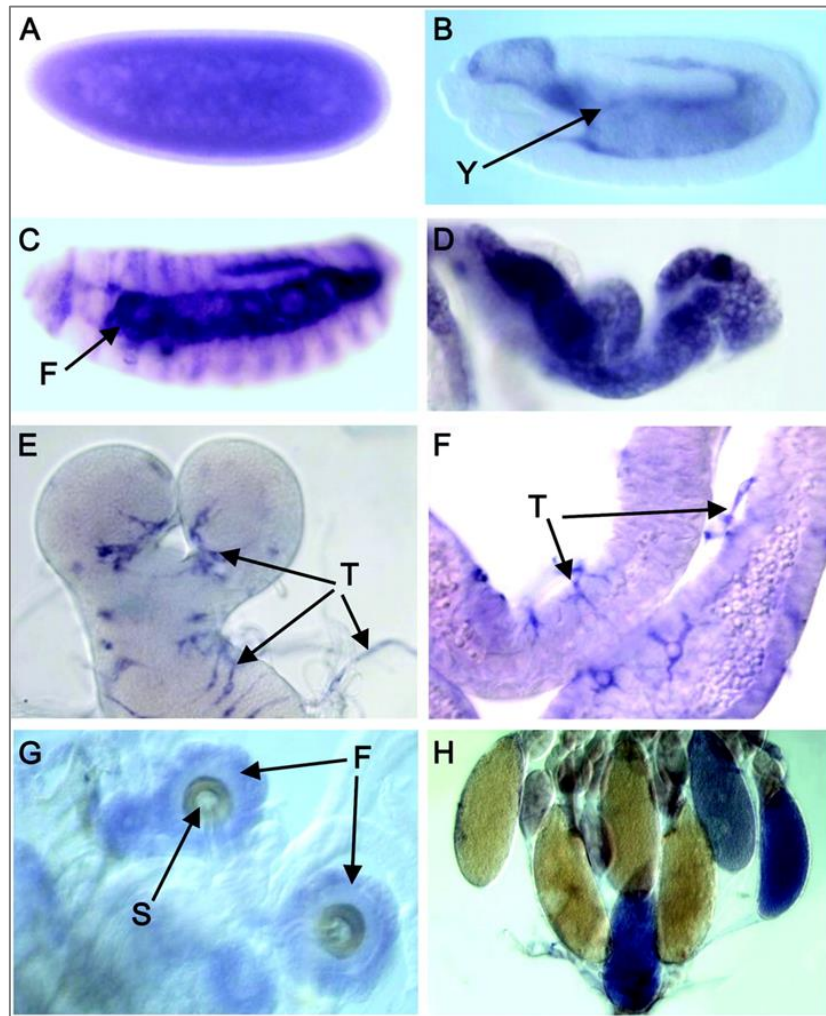


Abbildung 1-5. Detektion von *Glob1*-mRNA durch *in-situ*-Hybridisierung. A: Embryo, Stadium 5; B: Embryo, Stadium 12; C: Embryo, Stadium 16; D: Fettkörper larval; E: Gehirn larval; F: Darm adult; G: Spermatheca; H: Ovarien. Die Anwesenheit von *Glob1*-mRNA ist anhand blauer Färbung sichtbar. Y: Dottersack; F: Fettkörper; T: Tracheolen und terminale Zellen; S: Spermatheca (Hankeln et al. 2002)

bei *Glob1* um eine Art Sauerstoffspeicher, dessen Expression der zu speichernden Sauerstoffmenge angepasst wird. In Übereinstimmung hiermit zeigten Analysen an Fliegen mit einem starken RNAi-vermitteltem *Glob1*-Knockdown, dass die reduzierte Expression von *Glob1* zu einer höheren Sterblichkeit adulter Fliegen unter Sauerstoffmangel führt. Unter normoxischen Bedingungen konnte dagegen kein nachteiliger Effekt festgestellt werden (Gleixner et al. 2016). In einer anderen Studie wurden ebenfalls Fliegen mit einem transkriptionellen Knockdown von *Glob1* untersucht, der durch ein im Promotorbereich integriertes P-Element initiiert wurde. Trotz deutlich geringerer Herabregulation der *Glob1*-mRNA wurde hier bereits unter normoxischen Bedingungen ein nachteiliger Effekt hinsichtlich der Entwicklung und Viabilität aller Fliegenstadien postuliert (Yadav et al. 2015). Ebenfalls bereits unter Normoxie wurde außerdem ein durch den Knockdown gestörter Ablauf der

Oogenese, sowie ein fehlerhafter Aufbau des F-Aktin-basierten Zytoskeletts beobachtet (Yadav und Sarkar 2016; Yadav et al. 2018). Diese sich zum Teil also widersprechenden Ergebnisse zur Glob1-Funktion lassen sich womöglich auf die unterschiedlichen Techniken des Knockdowns und die jeweilige schwer zu definierende residuelle Expression des Glob1-Gens zurückführen. Zur verbesserten phänotypischen Analyse der Funktion von Glob1 wäre daher ein kompletter genetischer Knockout von Glob1 in *Drosophila* dringend erforderlich.

Bei Glob2 und 3 handelt es sich um paraloge Genkopien, die durch eine Genduplikation innerhalb der Drosophilidae, d.h. vor der Aufspaltung des Subgenus *Sophophora* vor mindestens 40 Millionen Jahren entstanden sind (Gleixner et al. 2012). Die Gene beider Globine liegen in *Drosophila melanogaster* auf Chromosom 3 etwa 800 kb voneinander entfernt. Sie besitzen, wie auch das Gen für Glob1, drei Exons im kodierenden Bereich und weisen dabei die für Globine von Tieren und Pflanzen typischen Intronpositionen B12.2 und G7.0 auf. Bedingt durch N- und C-terminale Extensionen der Globindomäne sind beide Schwesterglobine mit 222 (Glob2), bzw. 195 Aminosäuren (Glob3) vergleichsweise lang. Aber auch innerhalb der Globindomäne weisen Glob2 und 3 zahlreiche Sequenzunterschiede gegenüber Glob1 auf, was auf eine erhöhte Evolutionsrate zurückzuführen ist (Burmester et al. 2006). Glob2 und 3 besitzen außerdem ein sehr spezialisiertes Expressionsmuster, das auf die Testes der Männchen beschränkt ist (Gleixner et al. 2012; Abbildung 1-6). Beide Proteine scheinen daher am Ablauf der Spermatogenese beteiligt zu sein, die genaue molekulare Funktion ist aber unbekannt. Ähnlich wie bei Glob1 konnte in adulten Männchen von *Drosophila melanogaster* eine herabgesetzte Expression von Glob2 und 3 unter Sauerstoffmangel beobachtet werden (Gleixner et al. 2012). Zwar wurde eine reziproke

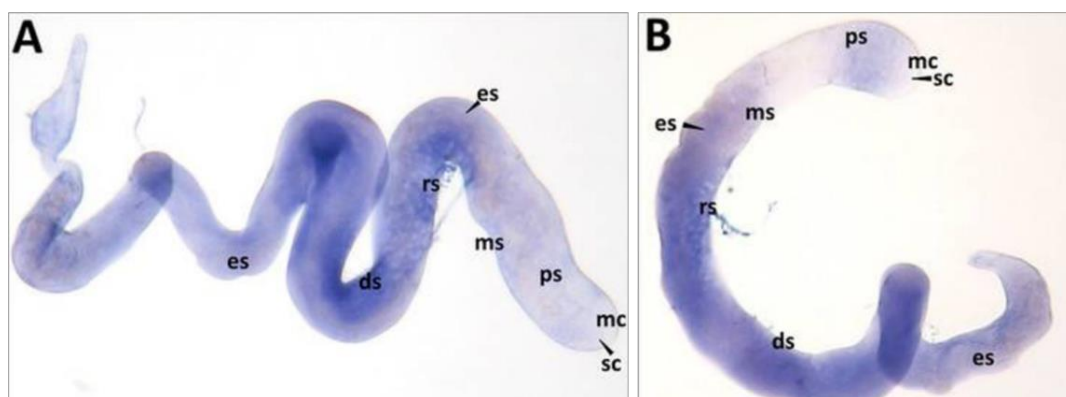


Abbildung 1-6. Detektion der mRNA von Glob2 (A) und Glob3 (B) in den Testes adulter Männchen durch in-situ-Hybridisierung. sc: Stammzellen; mc: mitotische Zellen; ps: primäre Spermatozyten; ms: meiotische Spermatozyten; rs: runde Spermatozyten; ds: frühe differenzierende Spermatozyten; es: späte elongierende Spermatozyten (Gleixner et al. 2012)

Erhöhung der Expression unter Hyperoxie nicht beobachtet, eine respiratorische O₂-Transportfunktion von Glob2 und 3 ist aufgrund des Expressionsmusters aber dennoch eher unwahrscheinlich. Mögliche Funktionen könnten dagegen im Schutz vor ROS oder in einer Signalfunktion während der Spermatogenese liegen. Zur genaueren funktionellen Analyse von Glob2 und 3 konnten im Vorfeld dieser Arbeit im Rahmen der Diplomarbeit von Eva Schweikert (2009) transgene Fliegenstämme generiert werden, die nach Kreuzung mit der *daughterless*-Gal4-Linie eine ubiquitäre Überexpression von Glob2 bzw. Glob3 aufweisen. Zusätzlich stand für Knockdown-Experimente ein kommerziell erhältlicher Stamm mit einem UAS-Glob3RNAi-Konstrukt zur Generierung von Fliegen mit einem transkriptionellen, RNAi-basierten Knockdown von Glob3 zur Verfügung, sowie zwei Stämme, die ein transposables Element innerhalb des Glob3-Gens besitzen, wodurch die Glob3-Transkription gestört werden könnte. Diese genetischen Modelle sollten erste phänotypische Analysen der Funktion von Glob2 und Glob3 in *Drosophila melanogaster* ermöglichen.

1.4 Ziele dieser Arbeit

- In den letzten Jahren konnten einige, teils sehr diverse Mitglieder der Globin-Proteinfamilie in verschiedenen Ordnungen des Arthropoden-Stammbaumes identifiziert werden. Dies gab Anlass zu der Annahme, dass Globine womöglich zum Genrepertoire aller Arthropoden gehören. Umfassende Kenntnis über das Auftreten von unterschiedlichen Typen von Globinen und deren Evolution in Arthropoden fehlte allerdings bislang, obgleich ein solches Wissen auch für die Klärung der physiologischen Funktionen der Globine wegweisend wäre. Zu diesem Zweck sollten die in den Datenbanken verfügbaren genomischen und transkriptomischen Daten von Arthropoden systematisch nach Globinsequenzen durchsucht werden. Durch phylogenetische Analysen sollte die Evolution der Arthropodenglobine anschließend auch im Vergleich zu den Globinen der Deuterostomier ergründet und Strukturmerkmale der Globine analysiert werden. Dieses, sowie Expressionsanalysen einzelner Globin-Vertreter in Modellspezies sollten zudem erste Hinweise auf mögliche Funktionen der Globine in Arthropoden liefern. Die Methoden und

Ergebnisse zu diesem Teil der Arbeit sind in Kapitel 3.1. “The globin gene family in arthropods: evolution and functional diversity” in Form eines wissenschaftlichen Artikels dargelegt.

- Neben der allgemeinen Analyse des Globinrepertoires der großen Familie der Arthropoden, sollten im speziellen die Funktionen der Globine des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* untersucht werden. Glob2 und 3 werden ausschließlich in den Testes der Männchen exprimiert und haben daher vermutlich eine bislang unbekannte Funktion in der Spermatogenese. Zunächst sollte die subzelluläre Lokalisation der Globine ermittelt werden und die hierfür benötigten, gegen Glob2 und 3 gerichteten Antikörper hergestellt und getestet werden. Zur weiteren funktionellen Analyse standen transgene Fliegen mit ubiquitärer Überexpression von Glob2 und 3 bzw. Fliegen mit einem möglichen transkriptionellen Knockdown von Glob3 zur Verfügung. Da es Hinweise auf eine sauerstoffabhängige Expression von Glob2 und 3 gab, sollten die Auswirkungen ihrer ektopischen, ubiquitären Expression auf die Vitalität der Fliegen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen getestet werden. Um eine Funktion von Glob3 in der Spermatogenese nachzuweisen und diese genauer zu charakterisieren, sollte in den Fliegen mit einem experimentellen transkriptionellen Knockdown von Glob3 der Ablauf der verschiedenen Phasen der Spermatogenese untersucht werden.
- Glob1 ist das bisher am besten untersuchte Globin von *D. melanogaster*. Allerdings lieferten voneinander unabhängige Studien an Fliegen mit einem transkriptionellen Knockdown von Glob1 widersprüchliche Ergebnisse zum Phänotyp und zur möglichen Glob1-Funktion (Yadav et al. 2015; Gleixner et al. 2016). Dies könnte auf technische Faktoren bezüglich unterschiedlicher Methoden des Glob1-Knockdowns zurückzuführen sein. Für eine spezifischere Analyse der Funktion von Glob1 wären daher Fliegen mit einem kompletten genetischen Knockout von Glob1 notwendig. Zu diesem Zweck sollten mittels der CRISPR/Cas9-Methode Fliegenstämme mit vererbbaarem genetischem Knockout von Glob1 für weitere funktionelle Analysen hergestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Fliegenhaltung und Methoden zur phänotypischen Analyse

2.1.1 Fliegenhaltung

Die Fliegen der Gattung *Drosophila melanogaster* wurden bei 25°C, bzw. 18°C in zylindrischen, mit Nährmedium befüllten Zuchtgefäßen gehalten. Nachdem die Fliegen in das Medium Eier gelegt hatten, wurden die Elterntiere entfernt. Die adulten Tiere der nächsten Generation wurden zur Eiablage in frische Zuchtgefäße überführt.

Fliegen-Nährmedium: 1,5% (w/v) Hefeflocken; 0,8% (w/v) Sojamehl; 8,3% (w/v) Maisgrieß; 0,8% (w/v) Agar-Agar; 7,3% (w/v) Malzextrakt; 3,6% (w/v) Zuckerrübensirup; 0,2% (w/v) Nigipagin; 0,5% Propionsäure

2.1.2 Fliegenstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1. Liste der verwendeten Fliegenstämme

Modulation der Expression von Glob2 und 3			
Stamm	Kommentar	Stock-Nr.	Herkunft
Gb3 Minos	Minos-Transposon in Glob3-Gen, balanciert mit TM6C	23520	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, USA
Gb3 piggyBac	piggyBac-Transposon in Glob3-Gen, balanciert mit TM6B	17929	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, USA
Glob3-RNAi	UAS-Glob3-RNAi; Glob3-Hairpin-Sequenz unter UAS-Kontrolle	104904	VDRC Stock Center, Wien, Österreich
Glob2-3'myc	Glob2-CDS mit myc-Tag an 3'-Ende unter UAS-Kontrolle		Schweikert 2009
Glob2-5'myc	Glob2-CDS mit myc-Tag an 5'-Ende unter UAS-Kontrolle		Schweikert 2009
Glob3-5'myc	Glob3-CDS mit myc-Tag an 5'-Ende unter UAS-Kontrolle		Schweikert 2009
daGal4	Treiberlinie mit Gal4-Expression unter Kontrolle des daughterless-Promotors	8641	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, USA

Kontrollen			
Stamm	Kommentar	Stock.-Nr.	Herkunft
white ⁻	Hintergrundstamm von daGal4 und Gb3RNAi	3605	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, USA
LLA11	Hintergrundstamm der UAS-Glob2/3-Stämme		Oberstein et al. 2005
Oregon-R	Wildtyp	5	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, USA
Glob1-Knockout			
Stamm	Kommentar	Stock-Nr.	Herkunft
PhiC31/attP40	X-chromosomale Expression der PhiC31-Integrase und attP-Integrationsstelle auf Chromosom 2	25709	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, USA
nos-Cas9	X-chromosomale Cas9-Expression	54591	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, USA
Balancer-Stämme (zur Verfügung gestellt von Dr. Olaf Vef, Institut für Genetik, Universität Mainz)			
Stamm	Morphologische Marker	Balancierte Chromosomen	
y ch v ; CyO / Sp	CyO: Curly (Cy)	Chromosom 2	
CyO / Pm ; TM6B / CxD	CyO: Curly (Cy); Pm: Plum (Pm) CyO/Pm: dumpy vortex (dpy)	Chromosom 2	
	TM6B: Humeral (Hu); CxD: Dichaete (D)	Chromosom 3	
TM6B / TM3	TM6B: Humeral (Hu); TM3: Serrate (Ser) TM6B/TM3: ebony (eb)	Chromosom 3	

2.1.3 Modulation von Sauerstoff-Bedingungen

Um *Drosophila*-Fliegen verschiedenen Sauerstoffbedingungen auszusetzen, wurde eine PRO-OX Sauerstoffkammer verwendet (BioSpherix, New York, USA). Die durchsichtige Kammer wurde zur Erzeugung von hyperoxischen Bedingungen mit technischem Sauerstoff (Westfalen AG, Münster) und für Experimente unter Hypoxie mit technischem Stickstoff (Westfalen AG, Münster) befüllt, wobei die Sauerstoffkonzentration jeweils durch einen Sauerstoffsensor E-702 (BioSpherix, New York, USA) gemessen und konstant gehalten wurde.

2.1.4 Ermittlung der Lebensdauer von *Drosophila melanogaster* unter Normoxie

Um die Lebensdauer verschiedener Stämme unter normoxischen Bedingungen zu ermitteln, wurde von jedem Stamm jeweils die gleiche Anzahl an Fliegen in ein Zuchtröhrchen überführt. Männchen und Weibchen wurden hierbei getrennt untersucht. Pro Woche wurden die Fliegen zweimal in ein frisches Zuchtgefäß überführt und die toten Fliegen ausgezählt. In vier Durchgängen wurde die Lebensdauer von insgesamt jeweils 245 männlichen und weiblichen Fliegen jedes Stammes bestimmt.

2.1.5 Ermittlung der Lebensdauer von *Drosophila melanogaster* unter Hyperoxie

Um den Einfluss einer erhöhten Expression von Glob2 und Glob3 auf die Überlebensdauer der Fliegen unter Hyperoxie zu testen, wurden pro Stamm jeweils 50 adulte Fliegen nach Geschlecht getrennt gesammelt und in Zuchtgefäßen mit Futterbrei überführt. Die Fliegen waren zu Beginn des Experiments ein bis vier Tage alt. Die Fliegen wurden bei einer Sauerstoffkonzentration von 95% gehalten und zweimal am Tag in neue Zuchtgefäße überführt. Dabei wurden die toten Fliegen ausgezählt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

2.1.6 Ermittlung der Toleranz von *Drosophila melanogaster* gegenüber Hypoxie

Für die Hypoxie-Experimente wurden jeweils 30 nach Geschlecht getrennte adulte Fliegen in leere Zuchtgefäße überführt und bei Raumtemperatur für 6 Stunden einer sehr geringen Sauerstoffkonzentration von 1,5% ausgesetzt. Die Fliegen fielen unverzüglich in einen bewegungslosen Stupor. Nach einer Erholungsphase unter normoxischen Bedingungen von zwei Stunden wurden die wieder aktiven, lebenden Fliegen ausgezählt. Der Versuch wurde viermal durchgeführt.

2.1.7 Fertilitätstest

Um die Fertilität der Männchen verschiedener Stämme zu untersuchen, wurden jeweils drei Männchen pro Stamm einzeln mit fünf jungfräulichen Weibchen des Stammes white⁻ in einem Zuchtröhrchen gehalten. An den nächsten vier Tagen wurde jeweils das Männchen aus dem Zuchtröhrchen entfernt und zu neuen weiteren fünf Weibchen in ein neues Röhrchen gegeben. Die Weibchen wurden nach jeweils fünf Tagen Eiablage ebenfalls aus den Zuchtgefäßen entfernt und nach insgesamt 15 Tagen die Nachkommen gezählt.

2.1.8 Präparation von Testes aus *Drosophila*-Männchen

Um die Testes zu isolieren, wurden adulte männliche Fliegen in leeren Kulturgefäßen für kurze Zeit auf Eis gestellt, um sie zu betäuben. In etwa 20µl PBS oder TB-Puffer wurde daraufhin mit zwei feinen Pinzetten das Abdomen abgetrennt. Durch leichten Druck auf das Abdomen kamen die Testes zum Vorschein und konnten mit Pinzetten von anderem Gewebe befreit werden.

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

TB-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 6,8); 183 mM KCl; 47 mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM PMSF

2.1.9 Phasenkontrastmikroskopie von *Drosophila*-Testes

Um die verschiedenen Stadien der Spermatogenese zu beobachten wurden die isolierten Testes in 2µl PBS auf einen Objektträger überführt und ein Deckglässchen aufgelegt. Anschließend konnten die Testes unter Phasenkontrast dokumentiert werden.

2.1.10 Ermittlung der Spermien-Viabilität

Die Viabilität der reifen Spermien in den Samenbläschen wurde mit Hilfe des LIVE/DEAD Sperm Viability Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermittelt. Hierbei können durch die beiden interkalierenden Farbstoffe SYBR14 und Propidiumiodid lebende von toten

Spermien unterschieden werden. Lebende Spermien erscheinen durch den membrangängigen Farbstoff SYBR14 grün, tote Spermien durch Propidiumiodid rot. Die Samenbläschen wurden von den Testes präpariert und auf einem Objektträger in 20 µl Beadle solution gewaschen. Anschließend wurden die Samenbläschen auf einen neuen Objektträger in 8 µl Beadle solution überführt und mit einer feinen Nadel punktiert, so dass die Spermien heraustraten. Es wurde 1 µl SYBR14-Lösung (1:10 SYBR14 in DMSO) zugegeben und die Präparate für zwei Minuten in einer dunklen und feuchten Kammer inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Propidiumiodid folgte eine erneute Inkubation von zwei Minuten in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde ein Deckglas aufgelegt und mehrere Bereiche der Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 61, Olympus, Hamburg) dokumentiert. Dabei wurden die fluoreszierenden Spermien zügig mit einem FITC-Filter (SYBR14), bzw. einem TRITC-Filter (Phalloidin) fotografiert. Anschließend wurde das Verhältnis von grünen und roten Spermien jedes Präparates ermittelt. Pro Stamm wurden zwischen acht und 20 Präparate untersucht. Insgesamt wurden pro Stamm zwischen 800 und 10000 Spermien ausgezählt.

Beadle solution: 128,3 mM NaCl; 23 mM CaCl₂; 4,7 mM KCl

2.1.11 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung von Lebensdauer, Fertilität und Spermienviabilität wurden die Stichproben zunächst auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und auf Homogenität der Varianzen (F-Test) getestet. Bei Normalverteilung aller Stichproben und Varianz-Homogenität wurde ein zweiseitiger T-Test durchgeführt. In allen anderen Fällen wurden die Stichproben durch einen Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster*

Zur Präparation von genomischer DNA wurden ca. 15 adulte Fliegen mit einer Federstahlpipette in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff

eingefroren. Nach Zugabe von 200 µl DNA Puffer A wurden die Fliegen mit einem Micropistill grob zerkleinert und nach erneuter Zugabe von 200 µl DNA Puffer A gründlich homogenisiert. Das Homogenat wurde für 30 min bei 65°C im Heizblock inkubiert und nach Zugabe von 800 µl DNA Puffer B für 10 min auf Eis gestellt. Die Lösung wurde anschließend für 15 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand mit 600 µl Isopropanol gemischt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 16000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 5 min bei 16000 x g wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde für einige Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl HPLC-Wasser gelöst. Die Konzentration der DNA wurde mit einem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen.

DNA Puffer A: 100 mM Tris; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5% (w/v) SDS

DNA Puffer B: 1 Teil 5 M Kaliumacetat; 2,5 Teile 6M Lithiumchlorid

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit der TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Annealing-Temperatur wurde an die jeweils verwendeten Primer angepasst und lag in der Regel 5°C unter dem errechneten Schmelzpunkt der Primer. Die Elongationszeit wurde an die erwartete Länge des Amplifikats angepasst. Für eine Kolonie-PCR wurde ein Bakterienklon von einer Agar-Platte mit einer Pipettenspitze gepickt und in 10 µl HPLC-Wasser gelöst. Hiervon wurde 1µl als Template für die PCR eingesetzt.

2.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung des High Pure Purification Kits (Roche, Mannheim) bzw. des GenElute PCR Clean-Up Kits (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) jeweils nach den Angaben des Herstellers. Entgegen den Anweisungen wurden die PCR-Produkte in HPLC-Wasser statt in Elutionspuffer gelöst.

Für eine direkte Sequenzierung von PCR-Produkten wurden diese mittels ExoSAP-Aufreinigung vorbereitet. Hierfür wurden 2,25 µl Exonuklease I (20U/µl; NEB, Ipswich, USA) mit 9 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/µl; Roche, Mannheim) gemischt und auf 60 µl mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Zu einem PCR-Produkt mit einem Volumen von 50 µl wurden 12 µl der ExoSAP-Lösung zugegeben und für 25 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte anschließend für 15 min bei 72°C.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in vertikalen GENTERPHORESE-Gelkammern (GENTERprise, Mainz) durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente wurden Gele mit 0,8-2% Agarose in 1x TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden vor dem Beladen auf das Gel mit 6x Loading Dye Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt und die DNA-Fragmente bei 130 V in 1x TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Als Größenmarker wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in der Ethidiumbromidlösung für zwei Minuten gefärbt und anschließend in Wasser gewaschen. Die Dokumentation erfolgte mittels eines UV-Transilluminators (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen).

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

1x E-Puffer: 36 mM Tris; 30 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O; 10 mM Na₂EDTA

Ethidiumbromidlösung: 5 µg/ml EtBr in 1x E-Puffer

2.2.5 DNA-Fällung mit Ethanol

Zur Fällung von DNA wurde zu einer DNA-Lösung das dreifache Volumen kaltes Ethanol abs. und 1/10 Volumen 10x Dialysepuffer gegeben und für 30 min bei -20°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend bei 14000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl 70% EtOH für 15 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die DNA wurde anschließend in HPLC-Wasser gelöst.

10x Dialysepuffer: 3M NaCl; 0,25M Tris; 0,1M Na₂EDTA; pH 7,6; autoklaviert

2.2.6 Ligation von PCR-Produkten in Klonierungsvektoren

Für die Ligation von PCR-Produkten in Plasmide wurde das pGEM-TEasy-Vektorsystem (Promega, Madison, USA) verwendet. 7 µl des aufgereinigten PCR-Produkts wurden mit 1 µl pGEM-T Easy Vektor (10ng), 1 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.7 Transformation durch Elektroporation

Die Transformation von Plasmiden erfolgte durch Elektroporation in *E.coli*-Bakterien des Stammes DH10B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Hierfür wurden 2 µl des Plasmids mit 50 µl DH10B-Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis wurde die Küvette in ein Elektroporationsgerät gestellt und die Bakterien einem kurzen elektrischen Schock von 2500V ausgesetzt. Anschließend wurde unverzüglich 1 ml L-Medium hinzugegeben, der ganze Ansatz in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 37°C für 30 min inkubiert. 100 µl bis 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agar-Platten ausplattiert, die mit Ampicillin oder einem anderen, je nach Resistenzgen der Plasmide geeigneten Antibiotikum versetzt waren. Bei gewünschter Blau/Weiß-Selektion wurden Agarplatten verwendet, die zusätzlich IPTG und X-Gal beinhalten. Dadurch konnten Klone mit Integrat anhand ihrer weißen Färbung von blauen Klonen ohne Integrat unterschieden werden. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

L-Medium: 10g Trypton; 5g Hefeextrakt; 5g NaCl; in 1l H₂O lösen, autoklaviert

Lösung für Agar-Platten: 15 g Agar-Agar in 1l LB-Medium (+ 100 mg Ampicillin)

- **zzgl. IPTG:** 0,0476 g IPTG in 2ml Dimethylformamid
- **zzgl. X-Gal:** 0,1 g X-Gal in 2 ml Dimethylformamid

2.2.8 Übernacht-Kultur und Plasmidpräparation

Um die rekombinanten Plasmide zu vervielfältigen wurde mit einer Pipettenspitze ein Klon von der Agarplatte gepickt und in 4 ml L-Medium, das mit 100 µg/ml Ampicillin oder einem anderen geeigneten Antibiotikum versetzt war, überführt. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei 37°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979). Hierfür wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bzw. das PureYield Plasmid Miniprep Kit (Promega, Madison, USA) jeweils nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.9 DNA-Sequenzierung

Sanger-Sequenzierungen (Sanger et al. 1977) wurden von der Firma StarSEQ (Mainz) durchgeführt. Die Sequenzieransätze wurden nach den empfohlenen Angaben der Firma angesetzt.

2.2.10 RNA-Isolierung aus *Drosophila melanogaster*

Die RNA wurde jeweils aus ca. 20 adulten Fliegen oder aus Testes von ca. 30 Fliegen isoliert. Hierfür wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet, inklusive des optionalen DNase-Verdau. Die Konzentration und Qualität der Gesamt-RNA wurde mit einem NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), bzw. einem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gemessen.

2.2.11 Natriumacetat-Fällung von RNA-Proben

Bei zu geringer Konzentration oder Verunreinigungen der RNA-Proben wurde eine Fällung mit Natriumacetat durchgeführt. Diese entsprach der Fällung mit Ethanol (Kap. 2.2.5) mit dem Unterschied, dass statt des Dialysepuffers 1/10 Volumen 3M Natriumacetat verwendet wurde. Anschließend wurde eine erneute Konzentration- und Qualitätsbestimmung der RNA durchgeführt.

2.2.12 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Es wurde die reverse Transkriptase SuperScript III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.13 Quantitative Realtime Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der RNA-Expression wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde das 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Die Detektion der Amplifikate erfolgte mittels des interkalierenden Farbstoffs SYBR Green. Hierzu wurde der Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet.

Aufgrund der gleichen Menge an eingesetzter Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese (Kap. 2.2.12) konnten die cDNA-Proben direkt relativ zueinander verglichen werden. Zusätzlich wurden zur Quantifizierung der absoluten Kopienzahlen Plasmide verwendet, die die jeweils zu amplifizierende Sequenz enthielten. Hiervon wurde eine Standardverdünnungsreihe mit bekannten Kopienzahlen hergestellt und zusätzlich zu den cDNA-Proben während des qRT-PCR-Laufs mitgemessen. Um eine Verfälschung der Expressionsdaten durch eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde jeweils mindestens einer der verwendeten Primer so gewählt, dass er eine Exon-Intron-Grenze überspannt (Tabelle 2-2). Zusätzlich wurde für jede Messreihe eine Negativkontrolle ohne Template-DNA mitgeführt. Im Anschluss an die qRT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR zu überprüfen.

Alle Proben wurden jeweils in Triplikaten in folgendem Ansatz gemessen:

5 µl	Power SYBR Green PCR Master Mix
0,3 µl	forward-Primer
0,3 µl	reverse-Primer
x µl	Template-DNA (cDNA oder Standard-Plasmid)
y µl	HPLC-Wasser
<hr/>	
10 µl	Gesamtvolumen

Tabelle 2-2. Liste der für qRT-PCR verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz
DmeGlob2-qPCR-for	ATA TGA GGA TGC TGG CCA CC
DmeGlob2-qPCR-rev	CGT CAA CAG TCG TCC TAA GG
DmeGlob2-3'myc-qPCR-for	ACT AAG CAA TGG TCT GGC CC
DmeGlob2-3'myc-qPCR-rev	GCC GCA GAT CTA GTG CCT AA
DmeGlob2-5'myc-qPCR-for	CTG CGG GAA TTC AGC CAA ATC
DmeGlob2-5'myc-qPCR-rev	CGC CTT CTC CAC CAT TGT G

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Antikörpern

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurden für Glob2 und Glob3 spezifische Peptide synthetisiert und jeweils drei Kaninchen mit einem der Peptide immunisiert. Die Peptidsynthese und Immunisierung der Tiere wurde durch die Firma Pineda Antikörper Service (Berlin) durchgeführt. Zur Auswahl der Peptide wurde ebenfalls von der Firma Pineda Antikörper Service eine Epitopanalyse durchgeführt, die auf der Methode von Parker et al. (1986) basiert. Hierbei wurden Oberflächenprofile der Proteine erstellt und solche Peptide ausgewählt, von denen vorausgesagt wurde, dass sie sich an der Proteinoberfläche befinden. Zusätzlich wurde nach Bereichen mit mehreren geladenen Aminosäuren gesucht, da dies für eine höhere Avidität der Antikörper spricht. Aufgrund der Epitopanalyse wurden folgende Peptide synthetisiert und für die Immunisierung verwendet:

Glob2: NH₂-CRLTTVDDAGBRIVKVALGT-COOH

Glob3: NH₂-CWNLVLPFERRYGQDVFYSF-CONH₂

Nach 150 Tagen wurde den Tieren Blut entnommen und das Serum durch eine Affinitätsaufreinigung mit Hilfe des Pierce Sulfolink Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Hierbei wurden die Peptide zunächst reduziert und an eine Gel-Säule gekoppelt. Nach Blockierung von nicht spezifischen Bindungsstellen durch eine Cystein-Lösung wurde das Serum auf die Säule gegeben, so dass

22

die Antikörper spezifisch an die Peptide binden konnten. Die Säule wurde gewaschen und die Antikörper mit einem Glycin-Puffer aus dem Gel eluiert. Die Spezifität der Antikörper wurde anschließend durch Western-Blot getestet (Kap. 2.3.5).

2.3.2 Proteinextraktion aus *Drosophila melanogaster*

Für die Extraktion von Proteinen wurden ca. 20 adulte Fliegen, bzw. die Testes aus ca. 40 Männchen in 300 µl, bzw. 200 µl RIPA-Puffer mit einem Mikropistill homogenisiert. Der RIPA-Puffer wurde für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Nach Zugabe von 1 µl PBS-Proteinaseinhibitor wurden die folgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden dreimal für 3 sek mit einem Sonifier Cell Disrupter (Branson Ultrasonics, Danbury, USA) sonifiziert und anschließend für 15 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und der Zentrifugationsschritt so oft wiederholt, bis die Proteinlösung klar war.

RIPA-Puffer: 10 mM Tris; 1 mM CaCl₂; 0,5% Nonoxynol-40; 0,5% Desoxycholinsäure; 0,1% SDS; 150 mM NaCl; 10 mM NaF; 25 mM β-Glycerophosphat; pH 7,4

2.3.3 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) mit bekannten Proteinkonzentrationen zwischen 0 und 100 µg/ml erstellt. Die zu quantifizierenden Proteinextrakte aus adulten Fliegen wurden für die Messung 1:200 und 1:100 verdünnt, Proteinextrakte aus Testes wurden 1:100 und 1:50 verdünnt. Von allen Proben wurden je 50 µl in eine optische 96-Well-Platte überführt. Zur Doppelbestimmung wurde jede Probe zweimal aufgetragen. 2 Teile Roti-Quant (Roth, Karlsruhe) wurden mit 5,5 Teilen VE-H₂O verdünnt und jeweils 200 µl der Mischung zu den Proteinproben gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm mit einem µQuant Microplate Spektrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, USA) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der bekannten BSA-Konzentrationen bestimmt.

2.3.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecyl-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Für die Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt (Laemmli 1970). Hierfür wurde das Mini-PROTEAN 3 Cell-System (Biorad, Hercules, USA) verwendet. Zunächst wurden zwei Gele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen angesetzt:

	Sammelgel (6%)	Trenngel (12%)
VE-H₂O	2,2 ml	3,3 ml
30% Acrylamid	0,8 ml	3,2 ml
Puffer	1ml 4x Sammelgelpuffer	2ml 4x Trenngelpuffer
10% APS	20 µl	40 µl
TEMED	3 µl	6 µl

Durch die Zugabe von Ammoniumperoxisulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurde die Polymerisation der Gele eingeleitet. Zunächst wurde das Trenngel in die Gelkassette gegossen und mit 60%igem Isopropanol überschichtet. Nach vollendeter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Die Proben wurden vor der Beladung auf das Gel 1:1 mit Laemmli-Puffer versetzt und zur Denaturierung für 3 min bei 95°C inkubiert. Als Marker wurde zusätzlich der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei einer Spannung von 110 V im Sammelgel. Sobald die Proben das Trenngel erreichten, wurde die Spannung auf 200 V erhöht.

4x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris; 0,4% SDS, pH8,8

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

2x Laemmli-Puffer: 125 mM Tris; 4% SDS; 20% Glycerol; 10% β-Mercaptoethanol; 2 mM EDTA; 0,04% Bromphenolblau, pH 6,8 mit HCl

10x Elektrophoresepuffer: 250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1% SDS; pH 8,4

2.3.5 Western-Blot

Nach dem Auftrennen in einem SDS-Gel wurden die Proteine von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Hierzu wurde das Mini Trans-Blot Cell-System (Biorad, Hercules, USA) verwendet. Das Gel, die Nitrocellulose-Membran, Fiber-Pads und Filterpapier wurden in Tank-Blotting Puffer äquilibriert und nach Anleitung des Herstellers in die Blot-Apparatur eingesetzt. Geblottet wurde für 60 min bei einer Spannung von 100 V.

Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde mit einer reversiblen Ponceau S-Färbung überprüft (Salinovich und Montelaro 1986). Hierfür wurde die Membran mit der Ponceau S-Lösung überschichtet und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend mit VE-H₂O wieder entfärbt.

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

Ponceau S-Lösung: 0,5% (w/v) Ponceau S in 1% Essigsäure gelöst

2.3.6 Antikörper-Bindung und ECL-Nachweis

Die Membran wurde zunächst für eine Stunde in einer 5%igen PBST-Magermilchpulverlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach Waschen mit PBST wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem verdünnten primären Antikörper inkubiert (siehe Tabelle 2-3). Am nächsten Tag wurde die Membran kurz mit PBST gespült und danach einmal für 15 min und dreimal für 5 min in PBST gewaschen. Anschließend wurde mit den jeweiligen sekundären Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit PBST gewaschen. Für den ECL-Nachweis wurde die Membran mit der ECL-Lösung überschichtet und anschließend ein BioMax Light Film (Kodak, Rochester, USA) zur Belichtung durch die leuchtenden Banden aufgelegt.

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

PBST: PBS + 0,2% Tween20

Lösung A: 50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris; pH 8,6

Lösung B: 11 mg p-Hydrocoumarinsäure in 10 ml DMSO

ECL-Lösung: 4 ml Lösung A; 400 µl Lösung B; 1 µl 37%iges H₂O₂

2.3.7 Strippen von Nitrocellulose-Membranen

Um Membranen erneut mit anderen Antikörpern behandeln zu können, wurden sie für 30 min bei 50°C in Stripping-Puffer inkubiert (Kaufmann et al. 1987). Nach zweimaligen Waschen mit PBST konnte die Membran erneut geblockt und mit einem primären Antikörper behandelt werden.

Stripping-Puffer: 62 mM Tris; 2% (w/v) SDS; 100 mM β -Mercaptoethanol; pH 6,7

2.3.8 Relative Quantifizierung der Proteinexpression durch Western-Blot

Zur Quantifizierung der Proteinexpression von transgenem Glob2-myc relativ zur Expression von endogenem Glob2 durch Western-Blot wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roth, Karlsruhe) verwendet. Diese wurde vor dem Blotten zunächst für ca. 15 Sekunden in Methanol aktiviert. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem Ablauf eines Western-Blots mit Nitrozellulose-Membran (Kap. 2.3.5). Die Detektion der ECL-Reaktion erfolgte über einen Molecular Imager FX (Biorad, München). Die Daten wurden anschließend mit dem Programm Quantity One Version 4.6.5 (Biorad, München) analysiert. Hierbei wurde die Intensität der distinkten Banden des transgenen Glob2-myc und des endogenen Glob2 miteinander verglichen. Die Expression des endogenen Glob2 wurde als 100% gesetzt.

2.3.9 Subzelluläre Fraktionierung

Zur Lokalisation des Glob2 innerhalb der Zelle wurde mit dem Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen, Hilden) eine subzelluläre Fraktionierung der Proteine aus Testes-Gewebe, bzw. abdominalem Gewebe von adulten Drosophila-Männchen durchgeführt. Es wurden zwischen 10 und 17 mg Gewebe eingesetzt und die Fraktionierung nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde das Gewebe homogenisiert und nacheinander mit verschiedenen Extraktionspuffern versetzt und zentrifugiert. Der jeweilige Überstand der einzelnen Zentrifugationsschritte beinhaltet dadurch jeweils die Proteine des Cytosols, der Membran, des Nukleus sowie des Cytoskeletts. Zur Überprüfung der Identität der einzelnen Fraktionen

und zur Lokalisation des Glob2 wurde anschließend ein Western-Blot durchgeführt (Kap. 2.3.5). Für den Western-Blot wurden pro Fraktion jeweils 20 µg Protein auf das SDS-Gel aufgetragen.

Tabelle 2-3. Liste der in den Western-Blot-Versuchen verwendeten Antikörper.

Primäre Antikörper			
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Herkunft
Anti-myc	Maus	1:1000 in PBST	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Anti-Aktin	Kaninchen	1:1000 in PBST	Sigma-Aldrich, St. Louise, USA
Anti-Histon H3	Kaninchen	1:2000 in PBST	Sigma-Aldrich, St. Louise, USA
Anti-α-Tubulin	Maus	1:500 in PBST	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA
Anti-GM130	Maus	1:500 in PBST	BD Transduction Laboratories, Lexington, USA
Sekundäre Antikörper			
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Herkunft
Anti-mouse IgG, HRP-konjugiert	Esel	1:5000 in PBST	GE Healthcare, München
Anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert	Esel	1:15000 in PBST	GE Healthcare, München

2.3.10 Immunfluoreszenz an *Drosophila*-Testes

Zunächst wurden die Testes adulter Männchen in TB-Puffer isoliert (siehe Kap. 2.1.8). Die Testes wurden anschließend in 2,5 µl TB-Puffer auf einen Objektträger überführt und mit einer feinen Pipette geöffnet. Nach Auflegen eines Deckgläschens wurden die Testes in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Deckgläschen wurde abgenommen und der Objektträger kurz in Ethanol abs. getaucht. Nach vorsichtigem Abtropfen des Ethanols wurde mit Fixogum

(Marabu, Stuttgart) ein hydrophober Ring um das Gewebe platziert. Innerhalb des Rings wurde das Gewebe für 20 min in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Testes für 30 min in PBST inkubiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Testes wurden daraufhin mit 10% FCS (fetales Kälberserum) in PBS für 20 min in einer feuchten Kammer blockiert. Nach Abziehen der Blockier-Lösung wurden die Testes mit dem primären Antikörper (Cleaved-Caspase-3-AK aus Kaninchen; Cell Signalling, Boston, USA, 1:200 in PBT) über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS wurde sowohl der sekundäre Antikörper (FITC-anti-rabbit, Dianova, Hamburg, 1:500 in PBT) als auch TRITC-Phalloidin (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA, 1:500 in PBS) auf die Testes gegeben und für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurde zweimal für 5 min in PBS gewaschen und mit DAPI (Roche, Mannheim, 0,5 µg in 10% FCS in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach erneuten zwei Waschschrritten wurde der hydrophobe Ring entfernt, das Gewebe mit Anti-Fading-Medium überdeckt und ein Deckgläschen aufgelegt, das mit Nagellack versiegelt wurde. Die gefärbten Testes wurden mit einem Olympus BX61 Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) und der Software CellF (Olympus, Hamburg) dokumentiert.

TB-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 6,8); 183 mM KCl; 47 mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM PMSF

Anti-Fading-Medium: 1mg p-Phenylendiamin in 1 ml phosphatgepuffertem Glycerol (50%)

Phosphatgepuffertes Glycerol (50%): 1 mM NaCl; 1 mM Na₂HPO₄ mit 1 mM NaCl; 1 mM NaH₂PO₄ auf pH 8 einstellen und 1:1 mit Glycerol mischen

2.4 Generierung von Fliegen mit genetischem Knockout von Glob1

2.4.1 Suche nach geeigneten Zielsequenzen für die Cas9-Endonuklease

Mit Hilfe des Programms GT-Scan (O'Brien und Bailey 2014) wurde die Sequenz des Glob1-Gens nach möglichen Zielsequenzen für die Cas9-Endonuklease durchsucht. Dabei wurde nach 18 bp langen Abschnitten gesucht, an deren 3'-Ende das benötigte PAM-Motiv NGG folgte. Um die Gefahr von möglichen *off-target*-Mutationen zu minimieren, wurde zusätzlich für jede Zielsequenz mit GT-Scan das Genom von *Drosophila melanogaster* (BDGP5) nach potentiellen *off-target*-Sequenzen durchsucht, die sich in weniger als vier Basen von der Glob1-Zielsequenz

unterscheiden. Dabei wurden auch Sequenzen berücksichtigt, die das alternative PAM-Motiv NRG aufweisen.

2.4.2 Herstellung des gRNA-Plasmids

Zur Integration der für das CRISPR-Experiment benötigten gRNAs in das *Drosophila*-Genom wurde das Plasmid pCFD5 verwendet (Port und Bullock 2016). Dieses besitzt neben einem β -Lactamase-Gen, das zu Ampicillin-Resistenz führt, eine attB-site zur Integration in das Fliegen-genom, sowie als optischen Marker ein vermilion-Gen, mit dessen Hilfe eine erfolgreiche Integration des Plasmids in das Genom anhand der Augenfarbe der Fliegen erkannt werden kann (Abbildung 2-1A). Der für das CRISPR-Experiment funktionelle Bereich des Plasmids setzt sich aus zwei hintereinanderliegenden Konstrukten zusammen, die jeweils aus einem tRNA-Gen, einer Spacer-Sequenz mit BbsI-Schnittstelle und einem gRNA-Kern-Anteil bestehen. Das gesamte tRNA/gRNA-Konstrukt steht unter der Kontrolle des Fliegen-spezifischen U6:3-Promotors. An die Stelle der Spacer-Sequenzen können spezifische Zielsequenzen für die Cas9-Endonuklease kloniert werden, wodurch zusammen mit den gRNA-Kern-Sequenzen komplette funktionelle gRNA-Sequenzen gebildet werden.

Zum Einfügen der Zielsequenzen wurden zunächst Primer generiert, die aus jeweils einer der Zielsequenzen und flankierenden, etwa 25 Basen langen tRNA-, bzw. gRNA-Sequenzen bestanden (Abbildung 2-1B). Mit diesen Primern und dem Plasmid als Template wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, das dem funktionellen Bereich des Plasmids entspricht, aber statt der Spacersequenzen die Zielsequenzen beinhaltet (Abbildung 2-1B; Tabelle 2-5). Die PCR wurde mit der KAPA-Hifi Polymerase (Roche, Mannheim) durchgeführt. Hierbei wurden 32 Zyklen durchlaufen, wobei mit einer Annealing-Temperatur von 61°C begonnen wurde, diese aber pro Zyklus um 0,5°C bis zu einer Temperatur von 72°C erhöht wurde. Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt (siehe Kap. 2.2.3).

Um das PCR-Produkt in das Plasmid einzufügen, wurde das Plasmid zunächst mit dem Enzym BbsI restringiert. Hierdurch entstand ein linearisiertes Plasmid, bei dem das eine Ende aus einer tRNA-Sequenz und das andere Ende aus der Sequenz des gRNA-Kerns bestand. Aufgrund dieser mit den Enden des PCR-Produkts übereinstimmenden Sequenzen konnte das PCR-

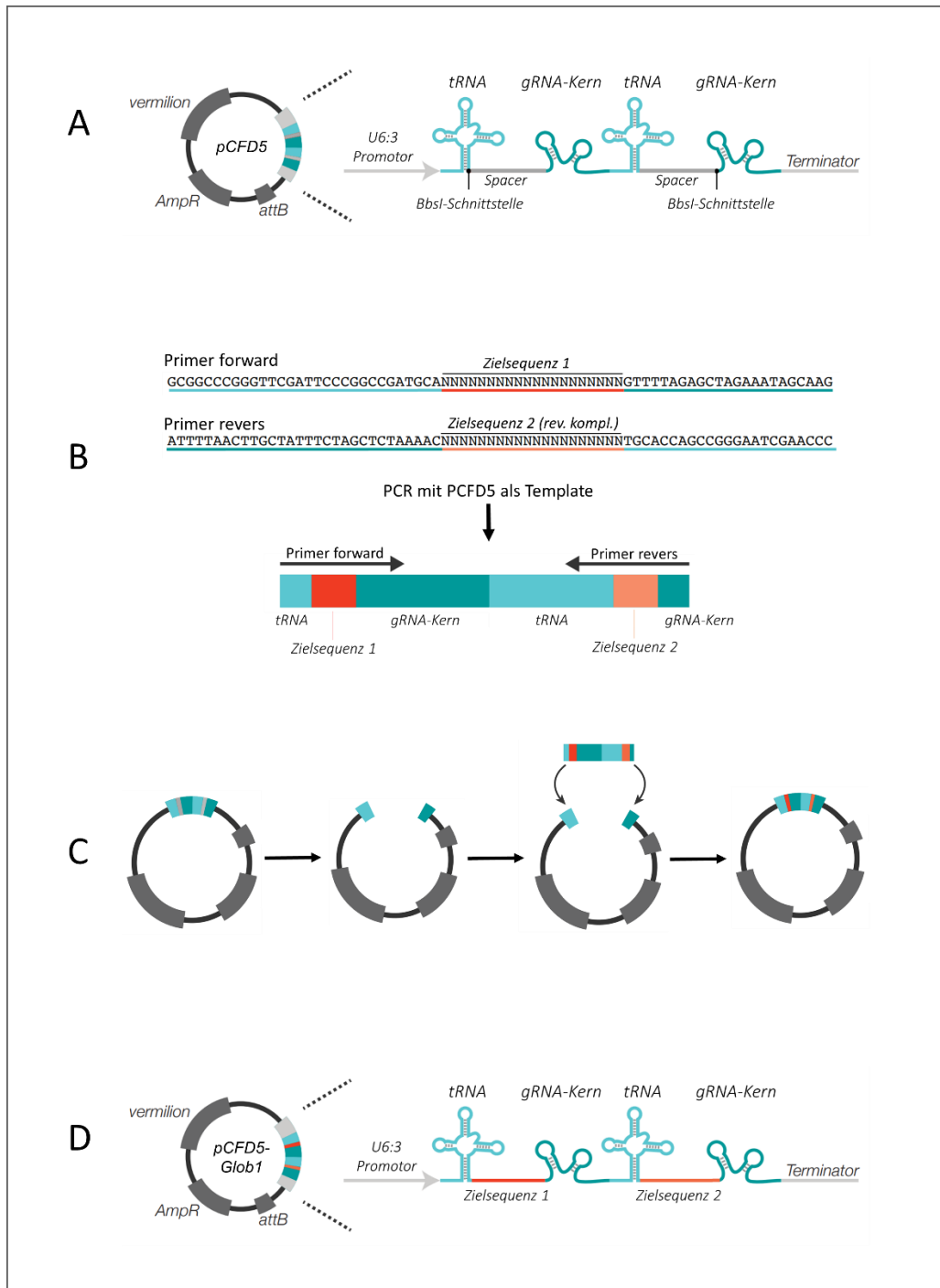


Abbildung 2-1. Generierung des Glob1-gRNA-Expressionsplamids. A: Aufbau des pCFD5-Plasmids mit internen Spacer-Sequenzen. B: Struktur der PCR-Primer mit integrierten Zielsequenzen und des PCR-Amplifikats. C: Linearisierung des Plasmids und Integration des PCR-Amplifikats durch homologe Rekombination. D: Fertiges pCFD5-Glob1-Plasmid mit integrierten gRNA-Zielsequenzen. Weitere Erläuterungen im Text. (verändert nach Port und Bullock 2016)

Produkt in das Plasmid durch homologe Rekombination eingefügt werden (Abbildung 2-1C). Hierfür wurde der NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, Ipswich, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dadurch wurde ein Plasmid hergestellt, das zwei verschiedene gRNA-Sequenzen trägt, denen jeweils eine tRNA-Sequenz vorangestellt ist und

die gemeinsam unter der Kontrolle des U6:3-Promotors stehen (Abbildung 2-1D). Zur Vervielfältigung wurde das Plasmid anschließend in *E.coli*-Zellen transformiert (Kap. 2.2.7) und mit Hilfe des PureYield Plasmid Miniprep Kits (Promega, Madison, USA) nach Angaben des Herstellers aus den Bakterienkulturen isoliert (Kap. 2.2.8). Das Plasmid konnte nun in *Drosophila*-Embryonen injiziert werden.

2.4.3 Transformation des gRNA-Plasmids in die Keimbahn von *Drosophila*-Embryonen

Transgenese mittels phiC31-Integrase

Die Integration des gRNA-Konstrukts in das Genom erfolgte mittels phiC31-Integrase (Groth et al. 2004). Die Plasmide wurden in Embryonen injiziert, die eine attP-Integrationsstelle auf Chromosom 2 sowie ein phiC31-Konstrukt auf dem X-Chromosom trugen (y1 v1 P{nos-phiC31\int.NLS}X; P{CaryP}attP40) (Bischof et al. 2007). PhiC31 steht hierbei unter der Kontrolle des nanos-Promotors, was zu einer keimbahnspezifischen Expression in den Weibchen und einer Ansammlung der transkribierten maternalen mRNA in den Polzellen der Embryonen führt (Wang und Lehmann 1991; Bischof et al. 2007). Nach der Injektion des gRNA-Plasmids in den posterioren Teil des Embryos kam es dadurch in der embryonalen Keimbahn zur Integration des Konstrukts an der attP-Integrationsstelle.

Vorbereiten von Injektionsnadeln und Plasmidlösung

Zur Herstellung der Injektionsnadeln wurden Glaskapillaren des Typs GB100TF-8P (Science Products, Hofheim) verwendet, die mit Hilfe eines Pullers P-97 (Sutter Instruments, Novato, USA) zu feinen Injektionsnadeln gezogen wurden. Die Parameter des Pullers sind dabei abhängig von der verwendeten Kapillare und des Heizfilaments. In diesem Fall wurden folgende Einstellungen gewählt: Heat=565; Pull=110; Velocity=80; Time=200.

10 µl der Plasmidlösung (350 µg/µl) wurden mit Patentblau gefärbt und für 30 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. 8µl des Überstandes wurden abgenommen und für die Injektion verwendet.

Injektion

Fliegen des PhiC31/attP-Stammes wurden zur Eiablage auf Zuchtröhrchen mit Apfelagar (32 g/l Agar-Agar in Apfelsaft) und etwas Hefe gesetzt und nach 20-30 Minuten wieder entfernt. Die Röhrchen wurden zunächst mit Wasser kurz ausgespült, um die Hefe zu entfernen. Anschließend wurde erneut Wasser in die Röhrchen gegeben und die Embryonen mit einem Pinsel vom Apfelagar gelöst. Die Embryonen wurden durch ein Gaze-Netzchen gefiltert, gründlich mit Wasser gespült und nach zusätzlichem kurzem Spülen mit 95% EtOH erneut mit Wasser gewaschen.

Ein Deckglässchen wurde mit einem Tropfen Wasser auf einem Objektträger fixiert und die Embryonen auf das Deckglässchen überführt. Die feuchten Embryonen wurden nebeneinander in der gleichen Orientierung aufgereiht und nach Trocknung mit Olivenöl bedeckt. Unter dem Mikroskop wurde nun die mit Plasmidlösung befüllte Injektionsnadel nacheinander in den posterioren Teil der Embryonen gestochen, wobei die Nadel bis zu etwa einem Fünftel der Embryonen eingeführt wurde. Mit Hilfe des Mikroinjektors Femtojet 5247 (Eppendorf, Hamburg) wurde eine geringe Menge der Plasmidlösung in die Embryonen injiziert und die Nadel anschließend wieder aus dem Embryo gezogen. Nach Injektion aller Embryonen wurde das Deckglässchen vom Objektträger gelöst, das Öl durch Spülen mit 95% EtOH entfernt und die Embryonen mit Wasser gewaschen und rehydriert. Das Deckglässchen wurde anschließend so in den Futterbrei eines Zuchtröhrchens gesteckt, dass die Embryonen mit der anterioren Seite fast das Futter berührten und die Larven so nach dem Schlüpfen direkt in den Brei kriechen konnten. Die Röhrchen wurden bis zum Schlüpfen der Larven in einer feuchten Kammer gehalten. Die Männchen wurden einzeln mit drei bis vier „y ch v“-Jungfrauen gekreuzt (Tabelle 2-6, Schritt 1). Männliche Nachkommen, bei denen erfolgreich das Plasmid in das Genom integriert wurde, konnten so anhand der braunen Augenfarbe identifiziert werden.

2.4.4 Generierung stabiler Stämme mit homozygoter Mutation von Glob1

Um eine CRISPR-vermittelte Mutation des Glob1-Gens herbeizuführen, wurden Fliegen mit integriertem gRNA-Konstrukt mit Fliegen gekreuzt, die eine maternale, keimbahnspezifische Cas9-Expression aufwiesen (y1 M{w[+mC]=nos-Cas9.P}ZH-2A w*). Dieser Stamm, bei dem die Expression der Cas9-Endonuklease unter der Kontrolle des nanos-Promotors steht, wurde

freundlicherweise von Dr. habil. Joachim Urban (Institut für Genetik, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Das dritte Chromosom dieses Stammes, auf dem später die Mutation stattfinden sollte, wurde zunächst isogenisiert, um sicherzustellen, dass dieses Chromosom keine Mutationen trägt, die im homozygoten Zustand zu schwerwiegenden Folgen wie Letalität oder Sterilität der Fliegen führen würden. Die Isogenisierung des dritten Chromosoms erfolgte gemäß des in Tabelle 2-4 dargestellten Kreuzungsschemas.

Tabelle 2-4. Kreuzungsschema zur Isogenisierung des Chromosoms 3 der Cas9 exprimierenden Fliegen

	♂		♀	
1a	FM7a/Y ;; TM6b/+	x	Cas9/FM7a	-> Cas9/Y ;; TM6b+
1b	FM7a/Y ;; TM3/+	x	Cas9/FM7a	-> Cas9/FM7a ;; TM3/+
2	Cas9/Y ;; TM6b/+	x	Cas9/FM7a ;; TM3/+	(einzelnes Männchen gekreuzt)
3	Cas9/Y ;; TM3/+	x	Cas9/FM7a ;; TM3/+	
4	Cas9/Y ;; +/+	x	Cas9/FM7a ;; +/+	

Zur Generierung der Fliegen, die sowohl die gRNAs, als auch Cas9 exprimieren und zur anschließenden Homozygotisierung des mutierten Glob1-Gens wurden eine Reihe von Kreuzungsschritten durchgeführt, die in Tabelle 2-6 detailliert aufgeführt sind. Zunächst wurde das transformierte gRNA-Konstrukt vermehrt und zweit- und drittchromosomale Balancer eingekreuzt (Tabelle 2-6, Schritte 2 und 3). Anschließend wurden balancierte gRNA-Männchen mit den isogenisierten Cas9-Weibchen gekreuzt (Tabelle 2-6, Schritt 4). In der nächsten Generation wurden einzelne doppeltransgene Männchen, in deren Keimbahn es nun zu CRISPR-vermittelten Mutationen kommen konnte, mit Balancer-Weibchen gekreuzt und die potentiell mutierten männlichen Nachkommen ebenfalls einzeln mit Weibchen des gleichen Balancer-Stammes gepaart, um das möglicherweise mutierte Glob1-Gen zu vervielfältigen und stabile Stämme zu erzeugen (Tabelle 2-6, Schritte 5-7). Um das Glob1 auf eine Mutation hin zu untersuchen, wurde die DNA von Fliegen jedes Stammes isoliert, das Glob1-Gen durch PCR amplifiziert und das PCR-Produkt nach einer ExoSAP-Aufreinigung sequenziert (siehe Kap. 2.2.3 und 2.2.9). Anschließend wurden Stämme erzeugt, die homozygot für das mutierte Glob1-Gen waren (Tabelle 2-6, Schritte 7-9). Zusätzlich wurde zu

jedem Stamm mit Glob1-Mutation ein weiterer Stamm ohne Mutation auf die gleiche Weise homozygotisiert, der von dem gleichen Männchen aus Schritt 5 abstammte. Dieser Stamm besitzt bis auf das Glob1-Gen den gleichen genetischen Hintergrund und kann daher als Kontrolle in nachfolgenden phänotypischen Untersuchungen verwendet werden.

Tabelle 2-5. Liste der für das CRISPR-Experiment verwendeten Primer

Herstellung des gRNA-Plasmids (integrierte gRNA-Zielsequenzen sind hervorgehoben)	
DmeGlob1-gRNA-pCFD5-for	GCG GCC CGG GTT CGA TTC CCG GCC GAT GCA TCG CTT CCG AGC ACA TGC GTT TTA GAG CTA GAA ATA GCA AG
DmeGlob1-gRNA-pCFD5-rev	ATT TTA ACT TGC TAT TTC TAG CTC TAA AAC AGG AGT CTT ACA ACG TAA TGC ACC AGC CGG GAA TCG AAC CC
Sequenzierung des pCFD5-Plasmids	
pCFD5-seq-for	ACG TTT TAT AAC TTA TGC CCC TAA G
pCFD5-seq-rev	GCC GAG CAC AAT TGT CTA GAA TGC
Amplifizierung des Glob1-Gens	
DmeGlob1-for	CAG CGA TGA GGT GCA ACT GAT
DmeGlob1-rev	GAT GAT TCC GTA GAC ATG GTC

Tabelle 2-6. Kreuzungsschema zur Generierung von Stämmen mit homozygoter Glob1-Mutation

	♂				♀			
Kreuzung einzelner injizierter Männchen	1	y v PhiC31 / Y ; (gRNA v+)* / attP40 ; + / +	x	y ch v / y ch v ; + / + ; + / +				
Kreuzung einzelner transgener Männchen zur Vermehrung des Transgens	2	y ch v / Y ; gRNA v+ / + ; + / +	x	y ch v / y ch v ; CyO / Sp ; + / +				
Einbringen eines dritt-chromosomalen Balancers	3	y ch v / Y ; gRNA v+ / CyO ; + / +	x	X / X ; CyO / Pm ; TM6B / CxD				
Generierung doppeltransgener Fliegen mit Cas9 und gRNA	4	X / Y ; gRNA v+ / CyO ; TM6B / +	x	Cas9 / FM7a ; + / + ; iso3 / iso3**				
Kreuzungen einzelner Männchen. Potentielle Mutationen des Glob1 in Keimbahn	5	Cas9 / Y ; gRNA v+ / + ; TM6B / iso3	x	X / X ; CyO / Pm ; TM6B / CxD				
Kreuzung einzelner Männchen zur Vermehrung des potentiell mutierten Glob1	6	X / Y ; CyO / ? ; TM6B / iso3(GlobKO)***	x	X / X ; CyO / Pm ; TM6B / CxD				
Generierung eines stabilen Stammes zur Genotypisierung des Glob1	7	X / Y ; CyO / Pm ; TM6B / iso3(GlobKO)	x	X / X ; + / + ; TM6B / TM3				
Generierung von Fliegen mit homozygot mutiertem Glob1****	8	X / Y ; CyO / + ; TM3 / GlobKO	x	X / X ; CyO / + ; TM3 / iso3				
Stamm mit homozygoter Glob1-Mutation	9	X / Y ; + / + ; GlobKO / GlobKO	x	X / X ; + / + ; GlobKO / GlobKO				

* gRNA-Konstrukt potentiell in der Keimbahn der injizierten Männchen eingebaut
 ** iso3 = isogenisiertes Chromosom 3
 *** mögliche Mutation des Glob1-Gens auf dem isogenisierten Chromosom 3
 **** zusätzlich wurde als spätere Kontrolle ein Stamm ohne Mutation homozygotisiert

3 Ergebnisse

3.1 The globin gene family in arthropods: evolution and functional diversity

The globin gene family in arthropods: evolution and functional diversity

Research Article

Andreas Prothmann¹,

Thorsten Burmester²,

Thomas Hankeln¹

¹Institute of Organismic and Molecular Evolution, Molecular Genetics & Genome Analysis, University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany

²Institute of Zoology and Zoological Museum, University of Hamburg, D-20146 Hamburg, Germany

Corresponding author: Thomas Hankeln
Institute of Organismic and Molecular Evolution
Molecular Genetics & Genome Analysis
Johannes Gutenberg-University Mainz
J. J. Becher-Weg 30A
D-55099 Mainz
Germany
Tel: (+49) 6131 – 393277
Fax: (+49) 6131 – 394585
e-mail: hankeln@uni-mainz.de

Key words: Hemoglobin, hypoxia, hexapoda, respiration

Running head: Insect globin diversity

Abstract

Globins are small heme-proteins that reversibly bind oxygen. Their most prominent roles in vertebrates are the transport and storage of O₂ for oxidative energy metabolism, but recent research has suggested alternative, non-respiratory globin functions. In the species-rich and ecologically most diverse taxon of arthropods, the copper-containing hemocyanin is considered being the prime respiratory protein. However, recent studies have suggested the presence of globin genes and their proteins in a broad range of arthropod taxa, including model species like *Drosophila*. To systematically assess the evolution and diversity of globins in arthropods, we searched available transcriptome and genome sequence data and found a conserved, widespread occurrence of three globin classes in arthropods, namely the hemoglobin-like (HbL), the globin X (GbX) and the globin X-like (GbXL) protein lineages. These three globin types were previously identified in protostome and deuterostome animals including vertebrates, suggesting their early ancestry in the Metazoa. The HbL genes show multiple, independent and taxon-specific gene duplications in all major arthropod clades, indicating functional versatility. Some HbL genes (*e.g.* *Glob2* and *3* of *Drosophila*) display a particularly fast sequence evolution, possibly indicative for the evolution of novel functions, *e.g.*, in male spermatogenesis. In contrast, arthropod GbX and GbXL globin variants show high evolutionary stability: the GbXL is represented usually by a single-copy gene in all arthropod lineages except Brachycera; the GbX clade is also widely present, and only specifically lost in holometabolan insects. Both globins show a brain-specific expression pattern. Most arthropod GbX and GbXL proteins, but also some HbL variants, include sequence motifs indicative of potential N-terminal acylation (*i.e.* N-myristoylation, 3C-palmitoylation). All arthropods except the brachyceran Diptera harbor at least one such potentially acylated globin copy, confirming the hypothesis of an essential, conserved globin function associated with the cell membrane. In contrast to other animals, the fourth ancient globin lineage, represented by neuroglobin, appears to be entirely absent in arthropods, and the putative arthropod orthologues of the fifth metazoan globin lineage, androglobin, lack a recognizable globin domain. Thus, the remarkable evolutionary stability of some globin variants is contrasted by occasional dynamic gene multiplication or even loss of otherwise strongly conserved globin lineages in arthropod phylogeny.

Introduction

Globins are small respiratory proteins that reversibly bind O₂ and other gaseous ligands by means of a prosthetic heme group. The globin core typically comprises ~140 amino acids and is built by eight α -helices (named A to H), which form a characteristic 3-over-3 α -helical sandwich structure (e.g. Dickerson and Geis 1983). While many members of the globin protein family have a role in O₂ supply, as classically exemplified by vertebrate hemoglobin (Hb) and myoglobin (Mb), they may also carry out a variety of alternative metabolic functions, such as O₂ sensing and the detoxification of reactive or nitrogen oxygen species, or they may even be components of intracellular signaling pathways (Burmester and Hankeln 2014; Tejero and Gladwin 2014; Luyckx et al. 2018). Globins are evolutionarily ancient proteins and have been identified in a broad range of animals, plants, fungi and bacteria (Hardison 1996; Weber and Vinogradov 2001). Phylogenetic analyses have indicated an early divergence of globin lineages in the Metazoa (Roesner et al. 2005; Blank and Burmester 2012; Hoffmann et al. 2012). Four major ancient globin clades were identified in animals, representing (i) neuroglobin (Ngb) and related proteins, (ii) globin X (GbX) and (iii) globin X-like (GbXL) proteins, which both are characterized by N-terminal acylation sites possibly mediating attachment to the cell membrane (Blank et al. 2011; Blank and Burmester 2012) and (iv) hemoglobin-like globins (HbL), which include the “typical” hemoglobins (Hb), myoglobins (Mb) and their relatives of vertebrates, other deuterostomes and protostomes (Blank and Burmester 2012; Hoffmann et al. 2012). A fifth ancient globin lineage is androglobin (Adgb), a large chimeric protein with an internal globin domain, which is conserved from basal metazoans to humans (Hoogewijs et al. 2012). The unexpected diversity of the metazoan globin family points at important, yet ill-defined physiological roles of this ancient protein class.

The species-rich taxon of arthropods is widely divergent in terms of organismal size, morphology and inhabited ecological niches, thus requiring specific adaptations in respiration metabolism. Arthropods typically possess copper-containing respiratory proteins in their hemolymph referred to as hemocyanins, which have been identified in all arthropod subphyla (Burmester 2002; Burmester and Hankeln 2007). There is thus little doubt that hemocyanins

that emerged already in the Cambrian or even earlier represent the ancestral respiratory proteins of arthropods (Rehm et al. 2012). Hemocyanins have recently been identified in several “lower” insect taxa, but have been lost in Eumetabola. Certain arthropod taxa lacking hemocyanins (e.g. the branchiopod crustaceans *Daphnia* sp. and *Triops* sp.) have replaced it by expression of Hb (Weber and Vinogradov 2001). In most hexapods, however, specialized respiratory proteins have long been considered unnecessary, because the tracheal system very efficiently delivers O₂ to the inner organs. Only in a few exceptional insect taxa that dwell in hypoxic environments Hb was observed to accumulate at high concentrations as a respiratory protein. For instance, in chironomid midges (Nematocera) extracellular Hb variants are used to transport and store O₂ in the hemolymph to ensure survival of the aquatic larvae under hypoxic conditions (Weber et al. 1985). Larvae of the botfly *Gasterophilus intestinalis* harbor large quantities of intracellular Hbs, which is used to store O₂ in the hypoxic environment of the horse's stomach (Keilin and Wang 1946; Dewilde et al. 1998). Additionally, some aquatic backswimmers (Notonectidae) use intracellular Hb to control buoyancy during diving (Matthews and Seymour 2006; Wawrowski et al 2012).

While these examples remained anecdotal for many years, more recent studies revealed the presence of globin genes in the genomes of a diverse set of insect taxa, including flies, mosquitoes, bees, beetles and lepidopterans (Burmester and Hankeln 1999; Hankeln et al. 2002; Burmester et al. 2006; Hankeln et al. 2006; Burmester and Hankeln 2007; Burmester et al. 2007; Kawaoka et al. 2009). These globins are probably expressed at lower concentrations than in the examples cited above and thus do not produce a characteristic red color of the animal tissues. The functions of these insect globins are not yet well established, although there is evidence that at least some of them are involved in the oxidative metabolism (Hankeln et al. 2002; Gleixner et al. 2016). For example, *Drosophila melanogaster* Glob1 shows the typical globin fold and displays conservation of the residues important for O₂ binding (de Sanctis et al. 2005). Deoxygenated Glob1, which has a hexacoordinate binding scheme at the Fe²⁺ ion, binds O₂ with a similar affinity like other respiratory insect globins. In larval and adult *Drosophila*, Glob1 is mainly expressed in tracheal cells and the fat body (Hankeln et al. 2002). Data from knockdown experiments indicate that Glob1 may be in fact involved in the O₂ metabolism of insects (Gleixner et al. 2016), although a different role for Glob1 in

maintenance of the cytoskeleton has also been proposed recently (Yadav and Sakar 2016; Yadav et al. 2018). *Drosophila* has two additional globins, Glob2 and Glob3, which are structurally derived and specifically expressed in the testis (Burmester et al. 2006; Gleixner et al. 2012). It is unlikely that they play a role in O₂ supply. Globin expression was also identified in visceral muscles of mosquitoes (*Anopheles gambiae*; Burmester et al. 2007), and in the tracheal system and Malpighian tubules of the honeybee (*Apis mellifera*; Hankeln et al. 2006), suggesting involvement in metabolic, possibly respiratory, processes.

Despite these initial observations, the presence of globins in arthropods and their role in arthropod physiology is clearly under-studied, especially in light of the emerging globin diversity in other metazoans. To understand the evolution of arthropod globins as an essential prerequisite to unravel their functions, we made use of the wealth of public genome and transcriptome data and present here a systematic survey of the globin variant repertoire in arthropods, with particular emphasis on insects. Additional functional analyses were performed employing structure prediction and gene expression analysis of selected globins based on RNA-Seq data and quantitative real-time RT-PCR.

Materials and Methods

Database searches and compilation of globin sequences

We performed a multitude of BLAST searches (Altschul et al. 1997) using the amino acid sequences of a representative set of already known arthropod globins plus vertebrate globins as initial query dataset. This dataset was systematically complemented with the sequences found during the initial search phases. The TBLASTN algorithm (with BLOSUM62 and 45 matrices) was used to screen the nucleotide, EST and TSA or whole genome sequences of arthropods available at GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). In addition, transcriptomic data of ostracoda (Oakley et al. 2013), accessible via the Dryad Digital Repository (<https://datadryad.org/>), were screened. Candidate globin sequences (e-value threshold < 1) were routinely subjected to a “reverse BLAST” search on the protein level to

confirm their globin identity. Incomplete or misannotated sequences were – if possible – manually corrected on the basis of the nucleotide sequences. Incomplete globin sequences were counted as a hit in defining the globin repertoire, but were not considered in phylogenetic reconstructions. The full list of the sequences used in this study is given in Supplemental Files 1 and 2.

In the special case of the chimeric Adgb, the newly detected arthropod Adgb sequences were aligned by Clustal with the known Adgbs to identify the position of their putative globin domain. Candidate globin domain parts were extracted from the larger Adgb sequence and rearranged to represent the standard order of globin alpha-helices (A to H) before using CDD (<http://structure.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer et al. 2015) and FUGUE (<http://mizuguchilab.org/fugue/prfsearch.html>) (Shi et al. 2001) to confirm their globin domain identity.

Multiple sequence alignments and phylogenetic analyses

The identified arthropod globins with full-length sequence information were complemented with selected deuterostome globins, representing sequences of all known globin clades (Blank and Burmester 2012), and two plant globins as outgroup. Multiple sequence alignments were constructed using several algorithms: three different strategies of MAFFT v6.9 (L-INS-i, E-INS-i and G-INS-i strategy) (Kato and Toh 2008; Kato et al. 2009), Muscle (Edgar 2004), Kalign2 (Lassmann et al. 2009), T-Coffee (Notredame et al. 2000) and Promals3D (Pei et al. 2008). The different alignments were tested using MUMSA (Lassmann and Sonnhammer 2005; Lassmann and Sonnhammer 2006) and the best-scoring alignment was used for further analysis. The ProtTest server (http://darwin.uvigo.es/software/prottest_server.html) (Abascal et al. 2005) was used to identify the best-fitting model of protein evolution. For phylogenetic analyses we used Bayesian and Maximum Likelihood (ML) methods. Bayesian reconstructions were performed using MrBayes v3.2.3 (Huelsenbeck and Ronquist 2001; Ronquist and Huelsenbeck 2003). The LG model plus gamma distribution was used, and two runs of six chains were performed for 10,000,000 generations. Trees were sampled every 1,000 generations, and the last 2,500 trees were used to calculate a consensus tree. ML analysis was conducted with

RAxML v7.7.1 (Stamatakis et al. 2008) using again the LG model with gamma distribution and 100 rapid bootstrap inferences were executed.

Prediction of myristoylation and palmitoylation motifs in globin sequences

The globin amino acid sequences were checked for motifs indicating N-terminal posttranslational acylation. For the prediction of N-myristoylation, we used the online tools Myristoylator (<http://web.expasy.org/myristoylator/>) (Bologna et al. 2004), PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) (Sigrist et al. 2002) and NMT-Predictor (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>) (Maurer-Stroh et al. 2002). Potential 3C-palmitoylation sites were predicted employing CSS-Palm 3.0 (<http://csspalm.biocuckoo.org/>) (Ren et al. 2008).

*Determination of the GbXL sequence of *Chironomus riparius**

To determine the GbXL sequence of *Chironomus riparius* for subsequent expression analyses, transcriptome data (Schmidt et al. 2013) were searched for GbXL sequences by TBLASTN using the GbXL sequence of *A. mellifera* as query. Two hits were identified, spanning 61 amino acid sites of the 5' end and 108 sites of the 3' end of the GbXL coding sequence, respectively. To verify the full length sequence, cDNA of whole L4 larvae was synthesized as described below and a PCR was performed using the following primers: 5'-ATGGGGTGTGAATTGGGAAA-ATTAG-3' and 5'-TCATGAGGCATCATTGGATCTTG-3'. After cloning into the pGEM-T Easy vector (Promega, Mannheim, Germany), both strands of the amplicon were Sanger-sequenced by a commercial sequencing service (StarSEQ, Mainz, Germany).

Analysis of tissue-specific expression of globins

Different tissues from n=48 *Chironomus riparius* L4 larvae were dissected, pooled and stored in RNA-Later (20mM EDTA, 25mM sodium citrate; 5,3M ammonium sulfate, pH 5.2). The RNA from brains, Malpighian tubules, and salivary glands was isolated using the NucleoSpin RNA XS Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and diluted in 10 µl RNase-free water. The RNA

from the fat body, the gut, and whole larvae was isolated with the RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and diluted the RNA in 30 µl RNase-free water. The quality and concentration of the RNA samples was evaluated using a NanoDrop (ND1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and a Bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). cDNA was generated with the SuperScript III reverse transcriptase (Life Technologies, Darmstadt, Germany) according to the instructions of the manufacturer using oligo(dT)-primers. 500 ng total RNA was applied from each sample. Quantitative real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) was performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the following primers: 5'-AAGTAATGGAGACGATGGATGAG-3' and 5'-CGGTACCTAATGTATCTGAAAC-3'. mRNA expression levels were calculated by the standard-curve approach, measuring the Ct-values. Each sample was measured in triplicates (technical replicates) and the mean Ct-value was calculated. To quantify differential gene expression, the expression in each tissue was calculated relative to the expression in the brain. The significance of the data was assessed by a two-tailed Student's t-test employing the Microsoft Excel spreadsheet program.

An *in silico* analysis of globin expression was performed for the honeybee *Apis mellifera*. We downloaded 18 tissue-specific datasets from the NCBI short read archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>; Supplemental Table 2). For Illumina datasets, we trimmed the 5'-ends, adapter sequences and low quality ends and filtered low quality reads (quality score below 20) using the fastx_toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). 454 pyrosequencing reads were trimmed and filtered with the CLC Genomics Workbench 5.5 (CLC Bio, Aarhus, Denmark), respectively. To calculate RPKM values (Mortazavi et al. 2008), the reads were mapped against the *Apis mellifera* genome v4.5 (GCF_000002195.4) using the tool *RNA-Seq Analysis* with default parameters from the CLC Genomics Workbench 5.5. For statistical analysis, the Rj values (Stekel et al. 2000) were calculated.

Results and Discussion

Respiratory proteins in arthropods: globins are present in all taxon lineages

The availability of complete genomes and transcriptomes of many different species provides the possibility to study systematically a large variety of arthropod taxa for the presence and expression of respiratory proteins. The copper-containing oxygen-binding hemocyanins have been identified in all arthropod phyla, but certain taxa have lost this type of respiratory protein. For example, no hemocyanin sequences have been found in the genomes of eumetabolan insects (Holometabola + Heteroptera) (Burmester 2002; Pick et al. 2009). The reason for the loss of hemocyanin is essentially unknown, but may be related to the development of more efficient mechanisms of O₂ uptake or other metabolic changes. At least in some arthropod species, hemocyanin has been replaced by hemoglobin as the principal respiratory protein (Weber and Vinogradov 2001; Burmester and Hankeln 2007; Burmester 2015). However, the diversity and evolution of globins in the arthropod phylum have been largely unknown. Therefore, we carried out a systematic search of the available genomes and transcriptomes from all arthropod taxa. We identified 266 globins with 293 globin domains from 80 arthropod species. In addition, three globin sequences were identified in the waterbears (Tardigrada). The full list of globin sequences is given in Supplemental File 1. The data showed that none of the arthropod species with a fully sequenced genome lacks a globin gene, and at least two distinct globin genes were detected per genome. Thus, in contrast to early interpretations of comparative genome analyses (Rubin et al. 2000), globins are indeed part of the standard gene repertoire of the arthropod genome.

Phylogeny reconstruction identified three major globin lineages in arthropods

A protein sequence dataset was composed that comprised 225 globin sequences, featuring a classical globin fold structure (note: the divergent, chimeric Adgb was excluded here; see below). The set included 172 arthropod globins, plus selected 51 deuterostome globins and two plant globins, i.e. LegHb1 of alfalfa (*Medicago sativa*) and LegHb2 of the yellow lupine (*Lupinus luteus*), that served as an outgroup in phylogeny reconstruction. From species harboring multiple closely related globin variants (e.g., the duplicated HbL copies in the midge *Chironomus riparius* and in branchiopods, see below), only selected representative sequences

were included. Otherwise, all arthropod globins with complete sequence information were used. The deuterostome dataset contained the 16 variant globin sequences of the lancelet *Branchiostoma floridae* and the 15 globins of the acorn worm *Saccoglossus kowalevskii*, respectively (Ebner et al. 2010; Hoffmann et al. 2012). The vertebrate globin set was represented by its major vertebrate-specific variants, i.e. Hb, Mb, Cygb, GbE and GbY, plus the more ancient Ngb and GbX (Burmester and Hankeln 2014). Together, these proteins cover all major globin clades that have been previously identified in metazoans (Blank and Burmester 2012). Alternative multiple sequence alignments were constructed using different programs and algorithms. The alignment obtained by MAFFT using the L-INS-i strategy gave the highest MUMSA score. This alignment, which covers a total of 595 amino acid positions (Supplemental File 3), was used for phylogenetic analysis using Bayesian and maximum likelihood reconstructions.

In previous studies, at least four major clades of globins had been identified in metazoans that apparently diverged before the split of the animal phyla (Blank and Burmester 2012; Hoffmann et al. 2012; Hoogewijs et al. 2012). A representative tree resulting from the Bayesian analysis of the complete globin dataset (Fig. 1) revealed that almost all arthropod globin variants grouped together with these previously defined globin types:

- Globins from a wide range of arthropod taxa joined the clades representing GbX and GbXL, globin variants, which are typically characterized by N- and C-terminal extensions containing candidate protein acylation motifs, with high statistical support (Bayesian posterior probability of 1.00; ML bootstrap values of 79 and 100, see Suppl. Fig. 1). Within the GbX and GbXL clades, arthropod globins displayed rather short branch lengths, consistent with a rather conservative sequence evolution of these globins (see below; Roesner et al. 2005). The arthropod GbX and GbXL sequences were monophyletic and largely reflected arthropod phylogeny. Note that GbXL, which is not present in vertebrates (Hoffmann et al. 2012), was however observed in all arthropod orders, while vertebrate GbX could not be found in the holometabolan insects (comp. Fig. 2).

The sister group relationship of the structurally similar GbX and GbXL, which was demonstrated before using smaller sized tree reconstructions mainly of deuterostome data (Blank and Burmester 2012; Hoffmann et al. 2012), could not be easily observed in our arthropod globin tree reconstructions (compare Supp. Fig. 1). This may be the consequence of the limited degree of phylogenetical information of the rather short globin sequences in general. We also note that GbX and GbXL form an unresolved trichotomy with three chelicerate globins (designated IscHbL5, CexHbL2, CexHbL3), which show increased branch lengths and thus may be responsible for artefactual long-branch attraction. These three proteins are the only arthropod globins that could not precisely be collated to one of the main globin types.

- None of the arthropod globin sequences joined the vertebrate/deuterostome Ngb lineage, arguing for an absence of Ngb in arthropods. It should be noted, however, that in sequence databases some arthropod globins have been erroneously designated as "neuroglobin/Ngb" (e.g., NP_001191927.1, XP_001946608.3), but actually represent GbX or GbXL genes according to our phylogenetical analyses.

- The majority of the remaining arthropod globins appeared to be more diverse with considerably longer branches in tree reconstructions. In the Bayesian tree of the large alignment dataset (Fig. 1), a monophyletic clade containing these arthropod globin variants together with the well-known vertebrate globins was supported, albeit rather weakly (Bayes pp 0.8). A Bayes tree consisting only of arthropod globins (Supp. Fig. 2) however showed strong support for the monophyly of this protein group (Bayes pp 1.0). Previous studies using datasets from deuterostome globins (Hoffmann et al. 2012) and under inclusion of some protostomes (Blank and Burmester 2012) had in fact also recovered the respective clade with reasonable support. In view the possible (distant) relatedness of these more diverse arthropod globins to the vertebrate globins, we tentatively propose to subsume them under the name "Hb-like" (HbL). This designation however is not meant to have any functional implications.

In summary, our reconstruction of arthropod globin relationships confirms the concept of a basic sub-division of the metazoan globin tree and suggests that arthropod globins, which have a classical globin fold, fall into either one of three main globin lineages, representing the

HbL, the GbX and the GbXL globin classes (Fig. 1, 2). These three globin types (plus a fourth, the Ngb) thus probably have evolved early in metazoan evolution before the split of proto- and deuterostomes. Within each of the three major globin clades, most of the arthropod globins were strictly separated from those of deuterostomes, suggesting an independent evolution of the variants within each taxon.

Arthropods lack neuroglobin and possess androglobins with degenerated globin domains

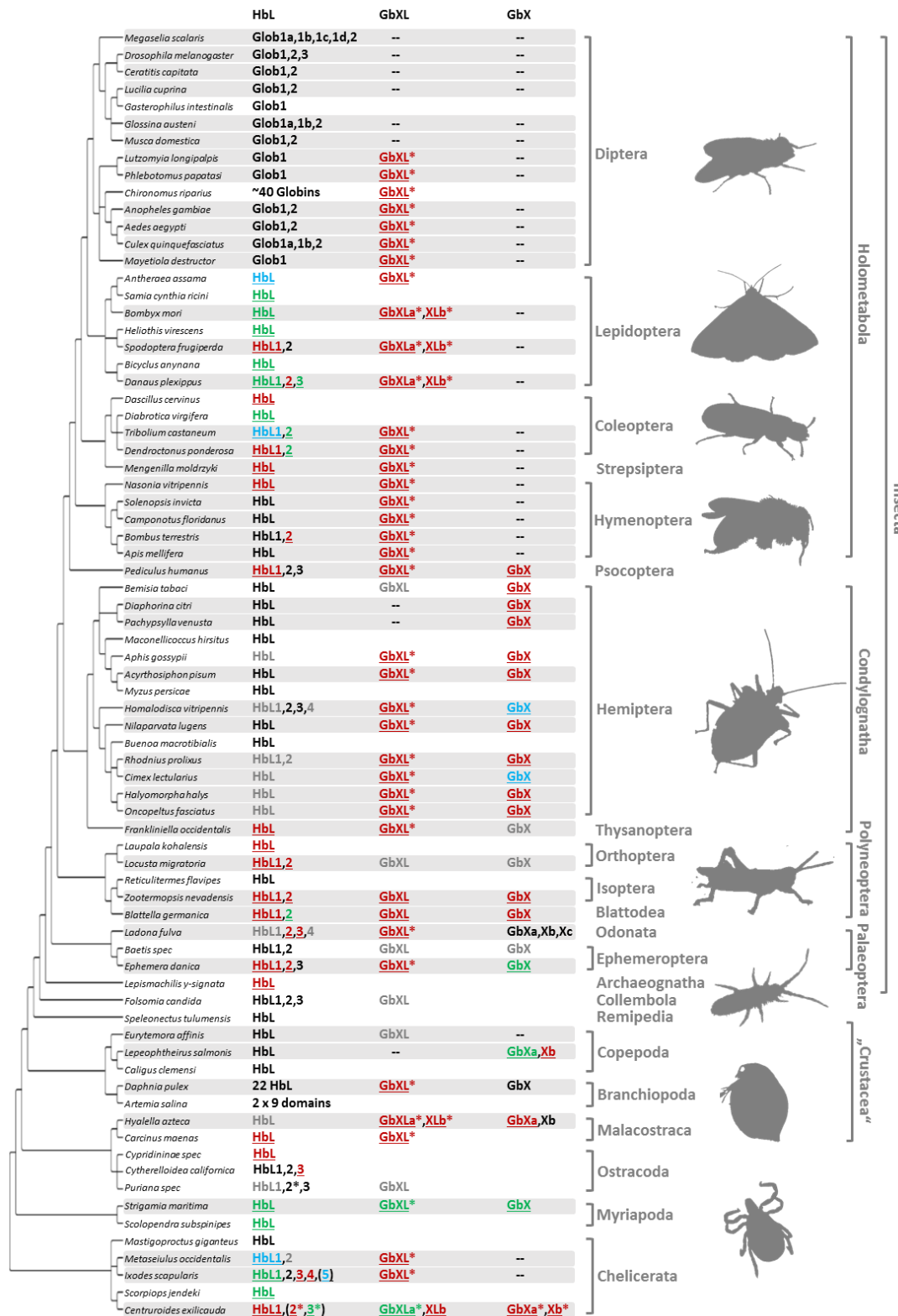
After its discovery in mammals, Ngb has been recognized as an ancient globin type present in many metazoan taxa, including deuterostomes, protostomes (Burmester et al. 2000; Ebner et al 2010), cnidaria (Blank and Burmester 2012) and placozoa (Dröge et al. 2012). Its early evolutionary origin and widespread occurrence have suggested an important functional role, which has been supported by many studies showing a cell-protective effect of Ngb in mammalian neurons (Review: Burmester and Hankeln 2014). The complete lack of Ngb in arthropods lead us to speculate that the functions of this globin may have been taken over by other members of the gene family.

Adgb is the most recent addition to the metazoan globin superfamily (Hoogewijs et al. 2012), but substantially different from the classical globins discussed above. This multidomain chimeric protein possesses a calpain-domain, a calmodulin-binding motif and a split and rearranged globin domain. In mammals, Adgb is mainly expressed in the testes and may play an important role in spermatogenesis. Adgb has been found in the genomes of a broad range of metazoan taxa, including arthropods like the honeybee, the carpenter ant and the human louse (Hoogewijs et al. 2012). However, the globin domain in these species proved to be degenerated. We identified twelve additional *Adgb* genes in arthropods, from most of the insect orders (Supplemental Table 1). However, no *Adgb* gene was found in the dipterans or in any arthropod subphylum other than the hexapods. Moreover, none of the potential globin domains of the hexapod Adgbs seems to be functional. Homology detection by FUGUE showed only weak, degenerated globin domains in some cases, whereas the NCBI CD-search identified none of the sequences as a globin (Supplemental Table 1). Normally, functioning globin proteins have two conserved histidines at positions E7 and F8, which are important for oxygen binding (see below). In most metazoan Adgbs, the distal E7 histidine is replaced by a

functional, conservative glutamine (Hoogewijs et al. 2012). However, all hexapod Adgb proteins lacked both, the distal histidine or glutamine and the proximal histidine (Supplemental Fig. 3). Thus, the Adgb globin domain in all arthropods appears to be heavily degenerated. It remains to be studied, in which tissues and cell types Adgb is expressed in arthropod taxa and if the iconic name, implying specific functionality in males, is semantically appropriate here.

HbL and GbXL globins are the most widely distributed variants in arthropods

The occurrence of the different types of globins was mapped onto the arthropod tree (Fig. 2). In most arthropod species, *GbX* as well as *GbXL* are single copy genes; only in moths, the scud *Hyalella acteca* and the barc scorpion *Centruroides exilicauda*, we found an additional copy of *GbXL*. Somewhat surprisingly, this *GbXL*, a globin variant which was first identified as a distinct globin class in deuterostomes and some protostomes, but which is absent from vertebrates (Hoffmann et al. 2012; Blank and Burmester 2012), was detected in almost every arthropod taxon with whole genome data, except for the brachyceran flies with its iconic model species *Drosophila*. Only the two psyllids *Diaphorina* and *Pachypsylla* and the copepod *Lepeophtheirus* apparently also lack *GbXL*, although one has to consider that these genome assemblies may still be incomplete. By contrast, *GbX* was not found in the large group of holometabolan insects, and also in mites and ticks (Acari) and in the copepod *Eurytemora*. The amount and quality of the sequence data from the Holometabola and Acari make it improbable that we missed the *GbX* gene due to incomplete assemblies. Rather, *GbX* appears to have been lost on several independent occasions in arthropod evolution, suggesting that it is dispensable for some taxa. It may be speculated that *GbX* and *GbXL* may substitute for each other in terms of molecular function, but much more detailed knowledge on the functional roles of these paralogues is required. We did not find any evidence for globins with multiple *GbX*- or *GbXL*-domains, suggesting that their single chain monomeric structure is important for their functions, which may be unlikely to be related to respiration (Blank et al. 2011).



HbL = Myristoylation site predicted by Myristoylator, Prosite and NMT Predictor
HbL = Myristoylation site predicted by two prediction tools
HbL = Myristoylation site predicted by only one prediction tool

HbL = no information on N-terminal sequence
* = 3C-Palmitoylation site predicted by CSS-Palm
() = Globins in parentheses cannot precisely collated to one of the major globin types

Fig. 2 Different globin lineages are present in arthropods. Shading indicates taxa with available genome data. Arthropod phylogeny has been taken from (Misof et al. 2014). Note the following for the designation of the HbL variants: within Diptera, only the name “Glob1” designates putative orthology to the Glob1 gene of *Drosophila melanogaster* (Burmester and Hankeln 1999), as defined by phylogenetic tree reconstruction. Closely related paralogues of Glob1 are named “Glob1a, b, c” etc. Outside Diptera, all gene variants have been designated by “HbL” and numbering of paralogues does not indicate orthology. The comparatively rare cases of GbX and GbXL gene duplicates have been assigned as “a, b, c”.

HbL was found in all arthropod species, suggesting that this globin type is an indispensable cornerstone of the arthropod globin gene repertoire. In contrast to GbX/GbXL, the HbL lineage is characterized by multiple independent gene duplications, which are specific to the respective arthropod taxa. The number of HbL copies usually ranges between 1 and 4. Only in two cases, a dramatic increase in HbL paralogues was observed, and in both instances the primary function of the globins are discussed with respect to oxygen supply: these are (1) the non-biting midges with more than 40 HbL copies (Kao et al. 1995; Trewitt et al. 1995; Hankeln et al. 1998), which are mostly considered to ensure O₂ transport in the hemolymph of the aquatic chironomid larvae (Weber and Vinogradov 2001) and (2) the branchiopod crustaceans, where Hbs are hypoxia-inducible and thus also probably relevant for respiration (Zeis et al. 2003; Guadagnoli et al. 2005).

Evolution of arthropod globin gene structure

Due to their phylogenetic ancestry and presence in all kingdoms of life, globins and their genes have been a model for investigating the evolution of intron-exon structure, which is underlying the “introns-early” versus “introns-late” debate (Rogozin et al. 2012). Two ancestral introns at the positions B12.2 (between codon positions 2 and 3 of the 12th amino acid of the B-helix) and G7.0 are highly conserved and present in many globins from animals and even plants. In fact, the possible adaptive value of this extraordinary conservation of intron positions is still not known. In addition, so-called central introns were found at variable positions in the E-helix of globins from a diverse range of taxa and interpreted as evidence for either a sliding of ancient introns or intron gain (Go 1981; Dixon and Pohajdak 1992; Stoltzfus and Ford Doolittle 1993; Hardison 1996; Hankeln et al. 1997). Investigating arthropod globin genes, we observed in part a very conservative evolution of intron-exon structure, but also a substantial degree of variability (Fig. 3, Supp. Fig. 4):

- Almost all arthropod GbXL genes showed the three-exon-two-intron structure with the conserved introns at B12.2 and G7.0. Only GbXL of the mite *Metaseiulus occidentalis* had an additional intron inserted between globin helices C and D (CD3.2), but lacked the ancestral B12.2 intron. The B12.2/G7.0 architecture appears to be ancestral for metazoan GbXL, since

it is shared with deuterostome GbXL (some of which however display additional central introns at divergent, non-homologous positions).

- GbX of arthropods typically displayed a four-exon-three-intron structure: in addition to the "classical" introns at B12.2 and G7.0, a third central intron at position E10.2 is present in most GbX orthologues. Only in the centipede *Strigamia maritima* and the scorpion *Centruroides exilicauda* GbX lacks the E10.2 intron, indicating a secondary loss. Furthermore, an additional intron was found in GbX of the water flea *Daphnia pulex* at position A12.2 and the louse *Pediculus humanus* in the N-terminal extension, respectively. The E10.2 position in arthropod GbX is shared with the GbX orthologues of vertebrates and other taxa (Roesner et al. 2005; Blank et al. 2011), arguing for its ancestrality in metazoan GbX. It is however unclear if the E10.2 intron, which distinguishes the GbX and GbXL genes, was already present before the ancient duplication of these variants.

- The intron positions in the arthropod HbL genes turned out to be more variable. Most HbLs again showed the typical introns at B12.2 and G7.0, but variations were found in several taxa (Fig. 3A). Prominent examples are the HbLs of the dipterans: the Glob1 genes of the Brachycera and the nematoceran Hessian fly *Mayetiola destructor* lost the intron at B12.2 and gained an intron at D7.0 instead. Likewise, Glob1 orthologues of the Psychodomorpha (*Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*) lack the intron B12.2, but have acquired a central intron at position E14.1. In the mosquitos, the Glob1 of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* gained a third central intron at E16.1, whereas Glob2 lacks the intron in the G-helix in all three analyzed mosquito species (cf. Burmester et al. 2007). Most of the multiple HbL copies of the midge *Chironomus* are intronless or have only a single intron in the E-helix at positions E9.1 or E15.0 (cf. Hankeln et al. 1997). Amongst the ca. 40 *Chironomus riparius* HbL genes, only a variant designated 3A shows the typical ancestral introns at B12.2 and G7.0, making this gene copy a possible candidate for the ancestral *Chironomus* HbL gene, which gave rise to the multitude of duplicated paralogues in this taxon. Further deviations from the common intron pattern were found in the HbL of the louse *Pediculus humanus*, the hemipterans *Homalodisca vitripennis* and *Nilaparvata lugens*, the mayfly *Ephemera danica*, in crustaceans (the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and the water flea *Daphnia pulex*) and in the Acari *Metaseiulus occidentalis* and *Ixodes scapularis*.

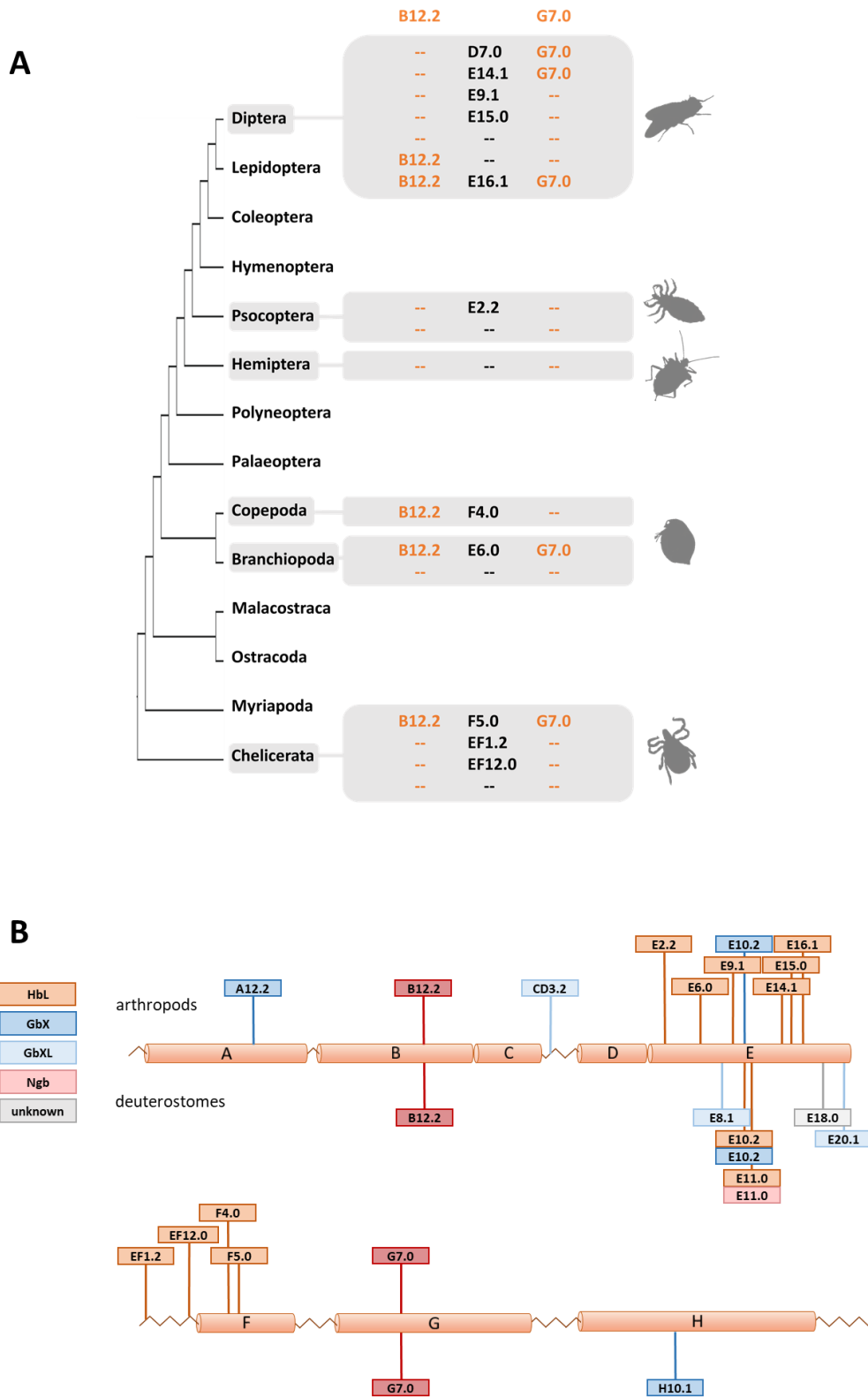


Fig. 3 Intron variability in Globins. **A.** Conserved and variable intron positions found in the globin fold of arthropod HbL genes with unusual intron pattern suggesting several cases of intron loss and intron gain. **B.** Distribution of intron positions along the globin fold of globin lineages in arthropods and deuterostomes. Note the conservation of the B12.2 and G7.0 intron positions and the positional variability of introns interrupting the central part of the globin fold.

By plotting the intron positions of arthropods and deuterostomes onto the globin fold structure, a considerable concentration of newly evolved globin intron sites around the helices E and F could be observed (Fig. 3B). Surprisingly, 15 out of 18 variant intron sites are positioned in or between these helices. The reason for this obvious bias is unclear, and the hypothetically underlying mechanisms of intron gain are still a matter of debate (for review, see Roy and Gilbert 2006; Yenerall and Zhou 2012). Specifically in globins, different mechanisms of intron gain have been postulated, namely an intron transfer between paralogous genes in the midge *Chironomus thummi* (Hankeln et al. 1997) and an intron gain caused by tandem genomic duplication in the lancelet *Branchiostoma floridae* (Ebner et al. 2010). Whereas the first model leads to new introns at the same position within paralogues, the latter explains the gain of entirely novel intron sites. We suggest that the diversity of gene structure observed in arthropod globins could make them suitable candidates for studying the underlying molecular mechanisms and potential functional consequences of intron gain, intron loss and intron site conservation.

Structural diversification of arthropod globins and functional implications

A comparison of the three globin types with a classical globin fold domain revealed differences in their protein lengths. The shortest arthropod globin variants are the HbL globins, which span on average 171 amino acids. Arthropod GbX (228 aa) and GbXL (199 aa) are considerably longer, mainly due to N-terminal extensions of the globin core. Specifically for arthropod GbX, the extensions are substantially longer than those of the vertebrate orthologues, having an average length of 195 aa. Future protein structural studies should address this unexplained, but potentially relevant feature.

Most classical globin proteins have three amino acid positions that are highly conserved because they are involved in heme group and gas ligand binding. These are a phenylalanine at position CD1 (*i.e.*, the first position in the loop between the helices C and D), and a distal and proximal histidine at helix positions E7 and F8, respectively. By studying the multiple sequence alignments, we found that these functionally important residues are overall very well conserved in arthropod globins. In 158 of the 172 analyzed globin sequences, all three important amino acids were present, which is indicative of an intact heme and O₂-binding. No

arthropod GbX or GbXL, but 14 HbL globins from Diptera, Branchiopoda, and Ostracoda showed notable variations at these conserved positions. Most deviations affected the distal histidine position E7: three HbL of dipteran flies (MscGb1A, CriHb3A, and AgaGb2) had a glutamine at E7, a replacement that has repeatedly been observed in various other Hbs and that is considered functionally conservative (Nagai et al. 1987). The E7 His>Glu replacement was also found in the di-domain HbL and the monodomain HbB and HbG of the water flea *Daphnia pulex*; other monodomain HbL variants of this species display yet other amino acids at E7, namely serine, alanine, arginine, and leucine. Leucine at E7 was previously observed in globins 6, 12 and 13 of the lancelet *Branchiostoma floridae* and may lead to a reduced O₂-affinity (Springer et al. 1994; Ebner et al. 2010). Notably, in some monodomain HbLs of *Daphnia* the otherwise invariant proximal histidine at position F8 was replaced by tyrosine (DpuHbC, E, F, and K) or proline (DpuHbB). It is therefore questionable whether these HbL domains can still bind O₂. The most striking deviation from the standard globin pattern was found in HbL2 of the ostracod *Puriana*, which turned out to be the only globin that carries mutations at all three functionally important sites (MetCD1, ValE7, ValF8). These drastic changes go along with a deviant position in the phylogenetic tree (Fig. 1) and make it likely that this crustacean globin acquired an alternative function, other than classical O₂ supply, which however remains to be investigated. Of note, a non-heme-binding globin domain protein has been reported in *Bacillus anthracis*, where it has been implicated to be involved in sensing fatty acid metabolism, chloride ions, and/or pH (Stranzl et al. 2011).

Comparing the speed of evolutionary change in the arthropod globin variants we observed that HbL, GbX, and GbXL showed substantially different degrees of sequence conservation. GbX and GbXL both turned out to be the most highly conserved globin classes. On average, the globin core of arthropod GbXL displayed an identity score of 67% and a similarity of 83% (based on a BLOSUM62 matrix). For GbX, the average identity/similarity score was 68%/81%. The replacement rate, which is low compared to other globins (Roesner et al. 2005), may indicate that amino acid residues in GbX and GbXL do not only build a globin fold, which is rather flexible in amino acid composition (Lesk and Chothia 1980), but may also interact externally with other proteins to exert a specific cellular role. In summary, the data suggest an essential and ancestral function of both globin types. This is in particular true of GbXL, which is almost ubiquitously present in arthropods orders, but has not been studied on a molecular

level in any organism so far. Because of this, we gathered initial information on the dominant expression sites of GbXL in arthropod species. qRT-PCR experiments on dissected larval tissues of the dipteran midge *C. riparius* and analysis of public RNA-Seq data from developmental stages and adult organs of the honeybee *A. mellifera* indicated that GbXL is mainly expressed in brain tissue (Fig. 4). This coincides with the dominant expression pattern of GbX in the vertebrate (zebrafish) brain (Blank et al. 2011). It remains to be investigated if in arthropods the cellular expression sites of GbX and GbXL do indeed overlap, which might then indicate a scenario of sub-functionalization between these ancient paralogues.

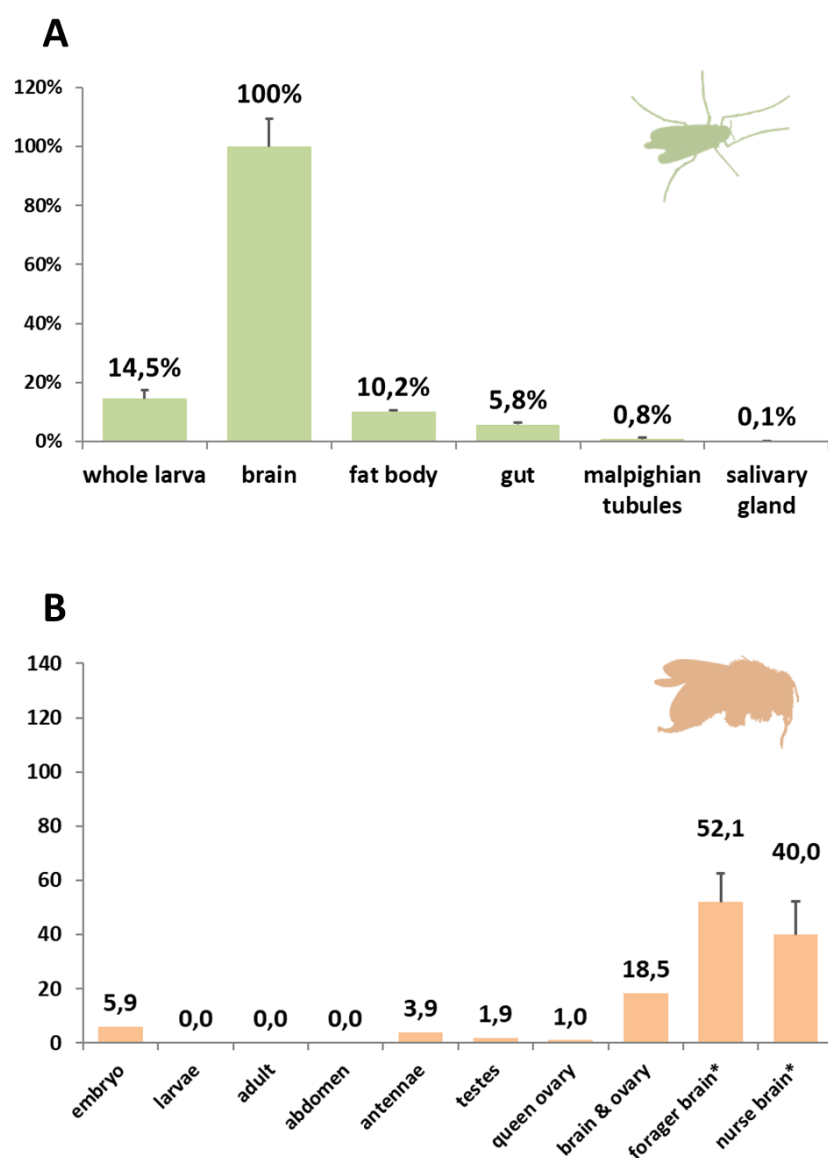


Fig. 4 Expression analysis of GbXL. A. qRT-PCR in larval tissues of the dipteran midge *C. riparius*. The expression level in brain was set to 100%. B. RNA-Seq expression analysis of GbXL transcription in different tissues of the honeybee *A. mellifera*. Expression levels are represented by RPKM values. *: For forager and nurse brain, five Illumina datasets were analyzed and the mean value is given. All other datasets were single and sequenced with the 454 GS FLX technique (Supplemental Table 3).

In contrast to GbX and GbXL, arthropod HbL proteins exhibited an average identity score of only 25% (46% similarity), which is in line with the considerably longer branch lengths observed for HbL in phylogenetic trees (Fig. 1, Supp. Figs. 1, 2). The overall faster sequence evolution is reflected by the lower preservation of crucial amino acid positions and the observed higher variability in gene structure (see above). It suggests that the cellular functions of HbL variants in arthropods are much more flexible and diverse. To further investigate this possibility, we have compared the phylogenetic tree reconstructed from arthropod HbL sequences with the taxon tree, as reported by Misof et al. 2014 (Supp Fig. 5). We observed that specifically HbL variants of Diptera and of Hemiptera fall into separate clusters of the tree, arguing for a vastly different sequence evolution and -possibly- function of the HbL copies in these insects. In fact, we have previously reported that the HbL variants in *D. melanogaster*, with Glob1 on the one hand and a duplicated gene pair named Glob 2 and 3 on the other, display completely different structural characteristics and gene expression profiles. While Glob1 is currently considered to fulfill a role associated with oxidative metabolism in tracheoles and fat body cells of embryonal larval and adult flies (Hankeln et al. 2002; Gleixner et al. 2008, 2016), Glob2 and 3 are exclusively expressed during spermatogenesis and may be important for male fertility (Gleixner et al. 2012). In conclusion, the multiple gene duplication events observed within the HbL class may have provided the basis for neo-functionalization events in the different arthropod lineages, which of course has to be proven experimentally.

N-terminal protein acylation motifs are widespread in most arthropod globin classes

Along with the discovery of several additional, novel members of the globin gene family in vertebrates, a number of hypotheses have been raised concerning their non-classical functions in vertebrate cells (Burmester and Hankeln 2014). In this respect, the recent finding that globins may indeed be attached to the cell membrane has received particular interest: using cell biological and biochemical methods, it has been demonstrated that the GbX protein of the zebrafish *Danio rerio* is bound to the cell membrane via N-terminal myristoylation and S-palmitoylation (Blank et al. 2011). Furthermore, it has been shown that GbX is able to protect cells from ROS *in vitro* (Koch and Burmester 2016). This precludes a standard respiratory function of GbX and instead suggests a role in the protection of membrane lipids from oxidative stress (Koch and Burmester 2016). Based on these previous findings we

performed a systematic bioinformatic search for the presence of candidate protein acylation sites in arthropod GbX and GbXL, but also in the HbL variants. The search for putative myristoylation motifs employing three different algorithmic tools showed a widespread distribution of these sites among all arthropod globin classes (Figs. 2, 5). In total, we identified 112 globins with a putative myristoylation motif, of which 86 were predicted by all three tools. Additional 20 globins were predicted to be myristoylated by two tools, and 6 potential sites were identified by a single prediction tool. In addition, we searched bioinformatically for putative palmitoylation sites. The vast majority of arthropod GbXL proteins was predicted to carry both, an N-terminal myristoylation and palmitoylation motif. Only in the GbXL proteins of the two polyneopteran species *Zootermopsis nevadensis* and *Blatella germanica* no palmitoylation motif was observed (Fig. 2). By contrast, most of the arthropod GbX proteins appeared to have lost the palmitoylation site, but retained the myristoylation motif. In fact, only the GbX of the bark scorpion *Centruroides exilicauda* was predicted to be palmitoylated. As other metazoan GbX typically harbor both, the myristoylation and the palmitoylation sites (Blank and Burmester 2012), the loss of the palmitoylation motif may have occurred within the arthropods.

Interestingly, an N-terminal myristoylation motif was also predicted in a larger number of arthropod HbL proteins. The phylogenetic distribution of HbL genes with acylation motif suggests that this property was ancestrally present in arthropod HbL. In fact, the functionality of a myristoylation motif in membrane-binding has previously been reported for a HbL globin variant of the green shore crab *Carcinus maenas* (Ertas et al. 2011). Independent losses of the myristoylation site probably occurred in several arthropod taxa (Figs. 2, 5). Noteworthy examples are the HbL proteins of the Hemiptera and Diptera, where a loss of the acylation motif coincides with an overall elevated rate of sequence change (as evidenced by long branches and unexpected phylogenetic affiliations in the tree reconstructions; Fig. 2, Supp. Fig. 5). We also point out that the brachyceran dipterans including its model taxon *Drosophila*, already having lost arthropod globin lineages GbX and GbXL, appear to be the only arthropods, which are devoid of *any* putatively acylated globin. The functional implications of this are currently unclear.

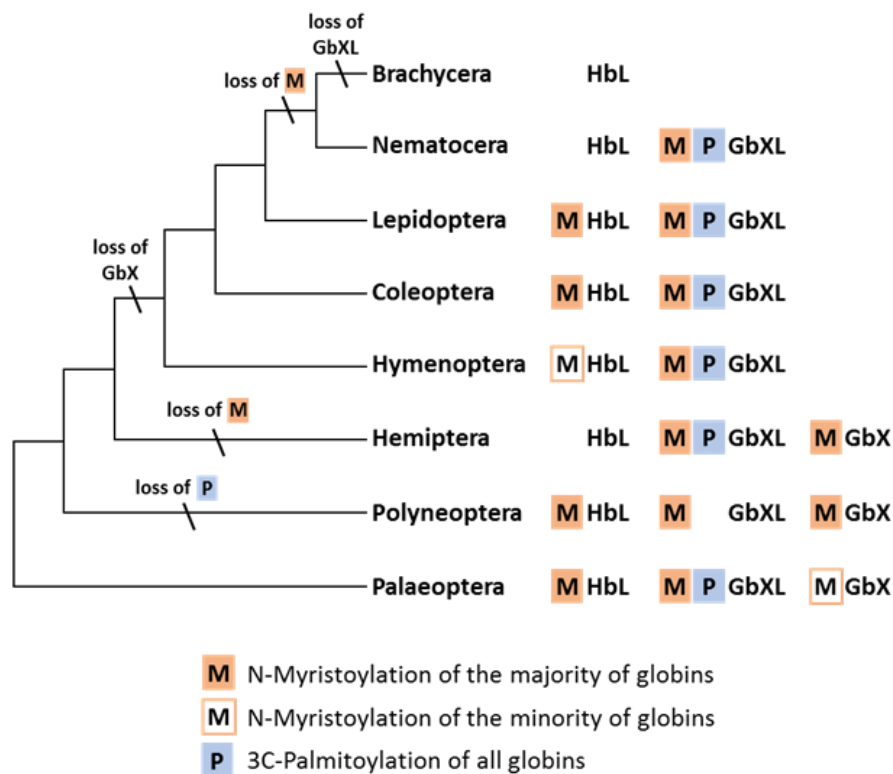


Fig. 5 Hypothetical evolution of protein acylation motifs in insect globin variants. The reconstruction indicates that protein acylation of all three globin types was an ancestral state. Differential loss of acylation motifs occurred independently in several lineages. Note the reduced globin complement and complete loss of acylation motifs in brachyceran dipterans. (M = N-myristoylation, P = 3C-palmitoylation.)

In summary, the overall widespread presence of candidate sequence motifs for protein acylation in all three arthropod globin lineages yields strong support to the hypothesis that a membrane attachment might reflect the ancient functional role of globins in this taxon and possibly also in metazoa (Ertas et al. 2011; Blank and Burmester 2012). Future gene expression analyses and functional studies should therefore address this possibility experimentally. The presence of either a combination of the two acylation motifs or their differential loss (Fig. 5) opens an additional way for an increased functional variability of arthropod globins during evolution. In the case of zebrafish GbX it could be demonstrated *in vitro* that the differential presence or absence of acylation motifs indeed influenced the intracellular localization of the globin (Blank et al. 2011).

Conclusions

The systematic bioinformatics search for globin sequences in arthropod genomes and transcriptomes revealed that all arthropods with available sequence data possess and express globin genes. The distribution of globin variants along the arthropod phylogeny suggests that the last common ancestor of arthropods, as well as the ancestor of the hexapods, harbored at least three distinct globin lineages, i.e. the diverse class of HbL which many times constitute a small gene sub-family, plus the rather conserved and most often single-copy GbX and GbXL.

In contrast to vertebrates (Burmester and Hankeln 2014) and other deuterostomes and protostomes (Ebner et al. 2010; Dröge and Makalowski 2011; Hoffmann et al. 2012), arthropods appear to have lost the Ngb lineage and display a heavily rearranged or degenerated globin domain inside the chimeric Adgb protein (Hoogewijs et al. 2012). Albeit their evolutionary most successful radiation on earth, arthropods thus display only 3 of the five putatively ancestral globin types of metazoa. In addition, the holometabolan insects have lost their GbX, and the brachyceran dipterans have additionally lost GbXL, thereby containing the most reduced globin repertoire within arthropods. To understand the full spectrum of globin function in arthropods, it is therefore dangerous to concentrate merely on the established model *D. melanogaster*. Conceivably, the functional role of the lost globin variants has successfully been compensated for. In principle, the remaining globins of the HbL type are possible candidates for facilitating such compensation: for instance, Glob2 and 3 of *Drosophila* and their homologues in other Brachycera are candidates for an Adgb-related function due to their conspicuous testes-specific expression pattern. It has also been demonstrated in the mollusc clam *Spisula* that an HbL globin was recruited to be highly expressed in nerve tissue, thereby possibly replacing neuroglobin (Dewilde et al. 2006).

With respect to possible globin functions, the presence of candidate protein acylation motifs in all three arthropod globin lineages requires particular attention by future experimental work, since it suggests that the arthropod globin ancestor may have been indeed been modified by N-myristoylation and, possibly, 3C-palmitoylation. In line with data for GbX in vertebrates (Blank et al. 2011; Blank and Burmester 2012; Koch and Burmester 2016), our bioinformatic data suggest an ancestral and essential function of globins in relation to cell membranes, conceivably either by a protective role or by intracellular signaling.

The class of HbL globins in arthropods is characterized by multiple gene-duplication events and rather appears to be most diverse in sequence evolution, suggesting the possibility of independent neo-functionalization events. Whatever the original cellular role of HbL globins may be in arthropods, it is not unexpected that these genes were secondarily recruited to evolve functional respiratory proteins. HbL globins thus facilitate O₂ supply in arthropod lineages adapted to low environmental O₂ conditions (Branchiopoda, Chironomidae, *Gasterophilus*; for review, see Weber and Vinogradov 2001) or have specialized functions like regulating diving buoyancy in backswimmers (Matthews and Seymour 2006; Wawrowski et al. 2012). Whether the HbL-type Glob1 of *D. melanogaster* is indeed also instrumental in oxidative metabolism is currently investigated, and alternative molecular roles have been proposed on the basis of the modulation of Glob1 expression by RNA interference (Hankeln et al. 2002; Yadav et al. 2015; Gleixner et al. 2016). Genetic ablation tools including CRISPR technology will probably be required to solve these discrepancies.

Acknowledgements

T.H. acknowledges support by an intramural “Stufe 1” grant from Johannes Gutenberg University Mainz. The study emerged out of a project supported by DFG (Ha2103/5-2 and Bu956/6-3). We thank Peter Herbener for his help in the expression analysis experiments.

Author Contribution

A.P. performed all database searches and analyses and wrote the manuscript. T.H. supervised the project and helped to write the manuscript. T.B. provided critical feedback and helped to write the manuscript.

References

- Abascal F, Zardoya R & Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 21,2104-2105.
- Altschul SF, Madden TL et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25,3389-3402.
- Blank M & Burmester T (2012) Widespread occurrence of N-terminal acylation in animal globins and possible origin of respiratory globins from a membrane-bound ancestor. *Mol. Biol. Evol.*, 29,3553-3561.
- Blank M, Wollberg J et al. (2011) A membrane-bound vertebrate globin. *PLoS one*, 6,e25292.
- Bologna G, Yvon C, Duvaud S & Veuthey AL (2004) N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics*, 4,1626-1632.
- Bolognesi M, Bordo D, Rizzi M, Tarricone C & Ascenzi P (1997) Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 68,29-68.
- Burmester T (2002) Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 172,95-107.
- Burmester T (2015) Evolution of Respiratory Proteins across the Pancrustacea. *Integr. Comp. Biol.*, 55, 792-801.
- Burmester T & Hankeln T (1999) A globin gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, 16,1809-1811.
- Burmester T & Hankeln T (2007) The respiratory proteins of insects. *J. Insect Physiol.*, 53,285-294.
- Burmester T & Hankeln T (2014) Function and evolution of vertebrate globins. *Acta physiologica*, 211,501-514.
- Burmester T, Klawitter S & Hankeln T (2007) Characterization of two globin genes from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: divergent origin of nematoceran haemoglobins. *Insect Mol. Biol.*, 16,133-142.
- Burmester T, Storf J, Hasenjager A, Klawitter S & Hankeln T (2006) The hemoglobin genes of *Drosophila*. *FEBS J.*, 273,468-480.
- Burmester T, Weich B, Reinhardt S & Hankeln T (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 407,520-523.
- de Sanctis D, Dewilde S et al. (2005) Bishistidyl heme hexacoordination, a key structural property in *Drosophila melanogaster* hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 280,27222-27229.
- Dewilde S, Blaxter M et al. (1998) Structural, functional, and genetic characterization of *Gastrophilus* hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 273,32467-32474.
- Dewilde S, Ebner B et al. (2006) The nerve hemoglobin of the bivalve mollusc *Spisula solidissima*: molecular cloning, ligand binding studies, and phylogenetic analysis. *J. Biol. Chem.*, 281,5364-5372.
- Dickerson RE & Geis I (1983) Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology. *Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.*
- Dixon B & Pohajdak B (1992) Did the ancestral globin gene of plants and animals contain only two introns? *Trends Biochem. Sci.*, 17,485-488.

- Dröge J & Makalowski W (2011) Phylogenetic analysis reveals wide distribution of globin X. *Biology direct*, 6,54.
- Dröge J, Pande A, Englander EW & Makalowski W (2012) Comparative genomics of neuroglobin reveals its early origins. *PLoS one*, 7,e47972.
- Ebner B, Panopoulou G et al. (2010) The globin gene family of the cephalochordate amphioxus: implications for chordate globin evolution. *BMC Evol. Biol.*, 10,370.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32,1792-1797.
- Ertas B, Kiger L, Blank M, Marden MC & Burmester T (2011) A membrane-bound hemoglobin from gills of the green shore crab *Carcinus maenas*. *J. Biol. Chem.*, 286,3185-3193.
- Gleixner E, Abriss D et al. (2008) Oxygen-induced changes in hemoglobin expression in *Drosophila*. *FEBS J.*, 275,5108-5116.
- Gleixner E, Herlyn H, Zimmerling S, Burmester T & Hankeln T (2012) Testes-specific hemoglobins in *Drosophila* evolved by a combination of sub- and neofunctionalization after gene duplication. *BMC Evol. Biol.*, 12,34.
- Gleixner E, Ripp F et al. (2016) Knockdown of *Drosophila* hemoglobin suggests a role in O₂ homeostasis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 72,20-30.
- Go M (1981) Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature*, 291,90-92.
- Guadagnoli JA, Braun AM, Roberts SP & Reiber CL (2005) Environmental hypoxia influences hemoglobin subunit composition in the branchiopod crustacean *Triops longicaudatus*. *J. Exp. Biol.*, 208,3543-3551.
- Hankeln T, Amid C, Weich B, Niessing J & Schmidt ER (1998) Molecular evolution of the globin gene cluster E in two distantly related midges, *Chironomus pallidivittatus* and *C. thummi thummi*. *J. Mol. Evol.*, 46,589-601.
- Hankeln T, Ebner B et al. (2005) Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.*, 99,110-119.
- Hankeln T, Friedl H, Ebersberger I, Martin J & Schmidt ER (1997) A variable intron distribution in globin genes of *Chironomus*: evidence for recent intron gain. *Gene*, 205,151-160.
- Hankeln T, Jaenicke V et al. (2002) Characterization of *Drosophila* hemoglobin. Evidence for hemoglobin-mediated respiration in insects. *J. Biol. Chem.*, 277,29012-29017.
- Hankeln T, Klawitter S, Kramer M & Burmester T (2006) Molecular characterization of hemoglobin from the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, 52,701-710.
- Hardison RC (1996) A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93,5675-5679.
- Hoffmann FG, Opazo JC et al. (2012) Evolution of the globin gene family in deuterostomes: lineage-specific patterns of diversification and attrition. *Mol. Biol. Evol.*, 29,1735-1745.
- Hoogewijs D, Ebner B et al. (2012) Androglobin: a chimeric globin in metazoans that is preferentially expressed in mammalian testes. *Mol. Biol. Evol.*, 29,1105-1114.
- Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17,754-755.

- Kao WY, Hankeln T, Schmidt ER & Bergtrom G (1995) Sequence and evolution of the gene for the monomeric globin I and its linkage to genes coding for dimeric globins in the insect *Chironomus thummi*. *J. Mol. Evol.*, 40,354-361.
- Katoh K, Asimenos G & Toh H (2009) Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol. Biol.*, 537,39-64.
- Katoh K & Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief. Bioinform.*, 9,286-298.
- Kawaoka S, Katsuma S, Meng Y, Hayashi N, Mita K & Shimada T (2009) Identification and characterization of globin genes from two lepidopteran insects, *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini*. *Gene*, 431,33-38.
- Keilin D & Wang YL (1946) Haemoglobin of *Gastrophilus* larvae. Purification and properties. *Biochem. J.*, 40,855-866.
- Koch J & Burmester T (2016) Membrane-bound globin X protects the cell from reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 469,275-280.
- Lassmann T, Frings O & Sonnhammer EL (2009) Kalign2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. *Nucleic Acids Res.*, 37,858-865.
- Lassmann T & Sonnhammer EL (2005) Automatic assessment of alignment quality. *Nucleic Acids Res.*, 33,7120-7128.
- Lassmann T & Sonnhammer EL (2006) Kalign, Kalignvu and Mumsa: web servers for multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.*, 34,W596-599.
- Lesk AM & Chothia C (1980) How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins. *J. Mol. Biol.*, 136,225-270.
- Luyckx E, Van Leuven W et al. (2018) Loss of Neuroglobin Expression Alters Cdkn1a/Cdk6-Expression Resulting in Increased Proliferation of Neural Stem Cells. *Stem cells and development*, 27,378-390.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK et al. (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.*, 43,D222-226.
- Matthews PG & Seymour RS (2006) Diving insects boost their buoyancy bubbles. *Nature*, 441,171.
- Maurer-Stroh S, Eisenhaber B & Eisenhaber F (2002) N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 317,541-557.
- Misof B, Liu S et al. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346,763-767.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L & Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 5,621-628.
- Nagai K, Luisi B et al. (1987) Distal residues in the oxygen binding site of haemoglobin studied by protein engineering. *Nature*, 329,858-860.
- Notredame C, Higgins DG & Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.*, 302,205-217.
- Oakley TH, Wolfe JM, Lindgren AR & Zaharoff AK (2013) Phylotranscriptomics to bring the understudied into the fold: monophyletic ostracoda, fossil placement, and pancrustacean phylogeny. *Mol. Biol. Evol.*, 30,215-233.

- Pei J, Kim BH & Grishin NV (2008) PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.*, 36,2295-2300.
- Perutz MF (1979) Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annu. Rev. Biochem.*, 48,327-386.
- Pick C, Schneuer M & Burmester T (2009) The occurrence of hemocyanin in Hexapoda. *FEBS J.*, 276,1930-1941.
- Rehm P, Pick C, Borner J, Markl J & Burmester T (2012) The diversity and evolution of chelicerate hemocyanins. *BMC Evol. Biol.*, 12,19.
- Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y & Yao X (2008) CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Engineering Design and Selection*, 21,639-644.
- Roesner A, Fuchs C, Hankeln T & Burmester T (2005) A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. *Mol. Biol. Evol.*, 22,12-20.
- Rogozin IB, Carmel L, Csuros M & Koonin EV (2012) Origin and evolution of spliceosomal introns. *Biology direct*, 7,11.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19,1572-1574.
- Roy SW & Gilbert W (2006) The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress. *Nat. Rev. Genet.*, 7,211-221.
- Rubin GM, Yandell MD et al. (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287,2204-2215.
- Schmidt H, Greshake B, Feldmeyer B, Hankeln T & Pfenninger M (2013) Genomic basis of ecological niche divergence among cryptic sister species of non-biting midges. *BMC Genomics*, 14,384.
- Shi J, Blundell TL & Mizuguchi K (2001) FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *J. Mol. Biol.*, 310,243-257.
- Sigrist CJ, Cerutti L et al. (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief. Bioinform.*, 3,265-274.
- Springer BA, Sligar SG, Olson JS & Phillips GN, Jr. (1994) Mechanisms of Ligand Recognition in Myoglobin. *Chemical Reviews*, 94,699-714.
- Stamatakis A, Hoover P & Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst. Biol.*, 57,758-771.
- Stekel DJ, Git Y & Falciani F (2000) The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries. *Genome Res.*, 10,2055-2061.
- Stoltzfus A & Ford Doolittle W (1993) Molecular evolution: slippery introns and globin gene evolution. *Curr. Biol.*, 3,215-217.
- Stranzl GR, Santelli E et al. (2011) Structural insights into inhibition of Bacillus anthracis sporulation by a novel class of non-heme globin sensor domains. *J. Biol. Chem.*, 286,8448-8458.
- Tejero J & Gladwin MT (2014) The globin superfamily: functions in nitric oxide formation and decay. *Biol. Chem.*, 395,631-639.

- Trewitt PM, Luhm RA, Samad F, Ramakrishnan S, Kao WY & Bergtrom G (1995) Molecular evolutionary analysis of the YWVZ/7B globin gene cluster of the insect *Chironomus thummi*. *J. Mol. Evol.*, 41,313-328.
- Vinogradov SN, Hoogewijs D et al. (2005) Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102,11385-11389.
- Wawrowski A, Matthews PG et al. (2012) Characterization of the hemoglobin of the backswimmer *Anisops deanei* (Hemiptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42,603-609.
- Weber RE, Braunitzer G & Kleinschmidt T (1985) Functional multiplicity and structural correlations in the hemoglobin system of larvae of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera): Hb components CTT I, CTT II beta, CTT III, CTT IV, CTT VI, CTT VII B, CTT IX and CTT X. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 80,747-753.
- Weber RE & Vinogradov SN (2001) Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol. Rev.*, 81,569-628.
- Yadav R, Kundu S & Sarkar S (2015) *Drosophila* glob1 expresses dynamically and is required for development and oxidative stress response. *Genesis*, 53,719-737.
- Yadav R, Nisha & Sarkar S (2018) *Drosophila* globin1 is required for maintenance of the integrity of F-actin based cytoskeleton during development. *Exp. Cell Res.*
- Yadav R & Sarkar S (2016) *Drosophila* glob1 is required for the maintenance of cytoskeletal integrity during oogenesis. *Dev. Dyn.*, 245,1048-1065.
- Yenerall P & Zhou L (2012) Identifying the mechanisms of intron gain: progress and trends. *Biology direct*, 7,29.
- Zeis B, Becher B, Lamkemeyer T, Rolf S, Pirow R & Paul RJ (2003) The process of hypoxic induction of *Daphnia magna* hemoglobin: subunit composition and functional properties. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 134,243-252.

Supplemental Material

Supplemental File 1. List of globin sequences

Supplemental File 2. Amino acid sequences of globins

Supplemental File 3. Multiple sequence alignment used for phylogenetic analysis

The supplemental files are provided in the electronic supplements

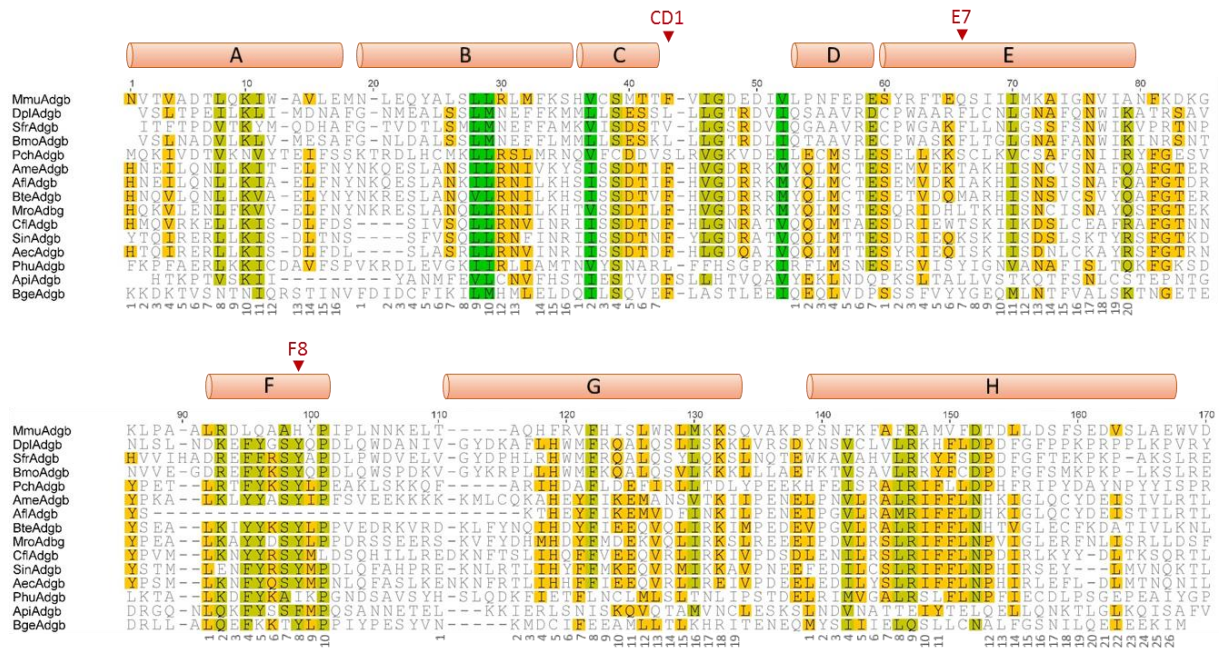
Supplemental Table 1. Analysis of globin domains in arthropod Adgb

class	order	species	Fugue			NCBI CD-search
			best globin hit (PDB code)*	Z-score**	confidence level**	e-value globin domain
Mammalia	Rodentia	<i>Mus musculus</i>	glob	7.81	CERTAIN	6.79e-07
Insecta	Lepidoptera	<i>Danaus plexippus</i>	no globin hit	-	-	no globin domain identified
		<i>Spodoptera frugiperda</i>	no globin hit	-	-	no globin domain identified
		<i>Bombyx mori</i>	no globin hit	-	-	no globin domain identified
	Coleoptera	<i>Pogonius chalceus</i>	hs3mvca	4.35	LIKELY	no globin domain identified
		<i>Dendroctonus ponderosa (partial sequence)</i>	no globin hit	-	-	no globin domain identified
	Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i>	hs1h97a	2.69	GUESS	no globin domain identified
		<i>Apis florea</i>	hs3mvca	2.52	GUESS	no globin domain identified
		<i>Bombus terrestris</i>	hs1h97a	2.72	GUESS	no globin domain identified
		<i>Megachile rotundata</i>	hs3mvca	2.83	GUESS	no globin domain identified
		<i>Camponotus floridanus</i>	hs3mvca	2.74	GUESS	no globin domain identified
		<i>Solenopsis invicta</i>	Bac_globin	2.77	GUESS	no globin domain identified
		<i>Acromyrmex echinatior</i>	no globin hit	-	-	no globin domain identified
	Psocoptera	<i>Pediculus humanus</i>	hs4bjaa	4.00	MARGINAL	no globin domain identified
	Hemiptera	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	no globin hit	-	-	no globin domain identified
	Polyneoptera	<i>Blatella germanica</i>	no globin hit	-	-	no globin domain identified

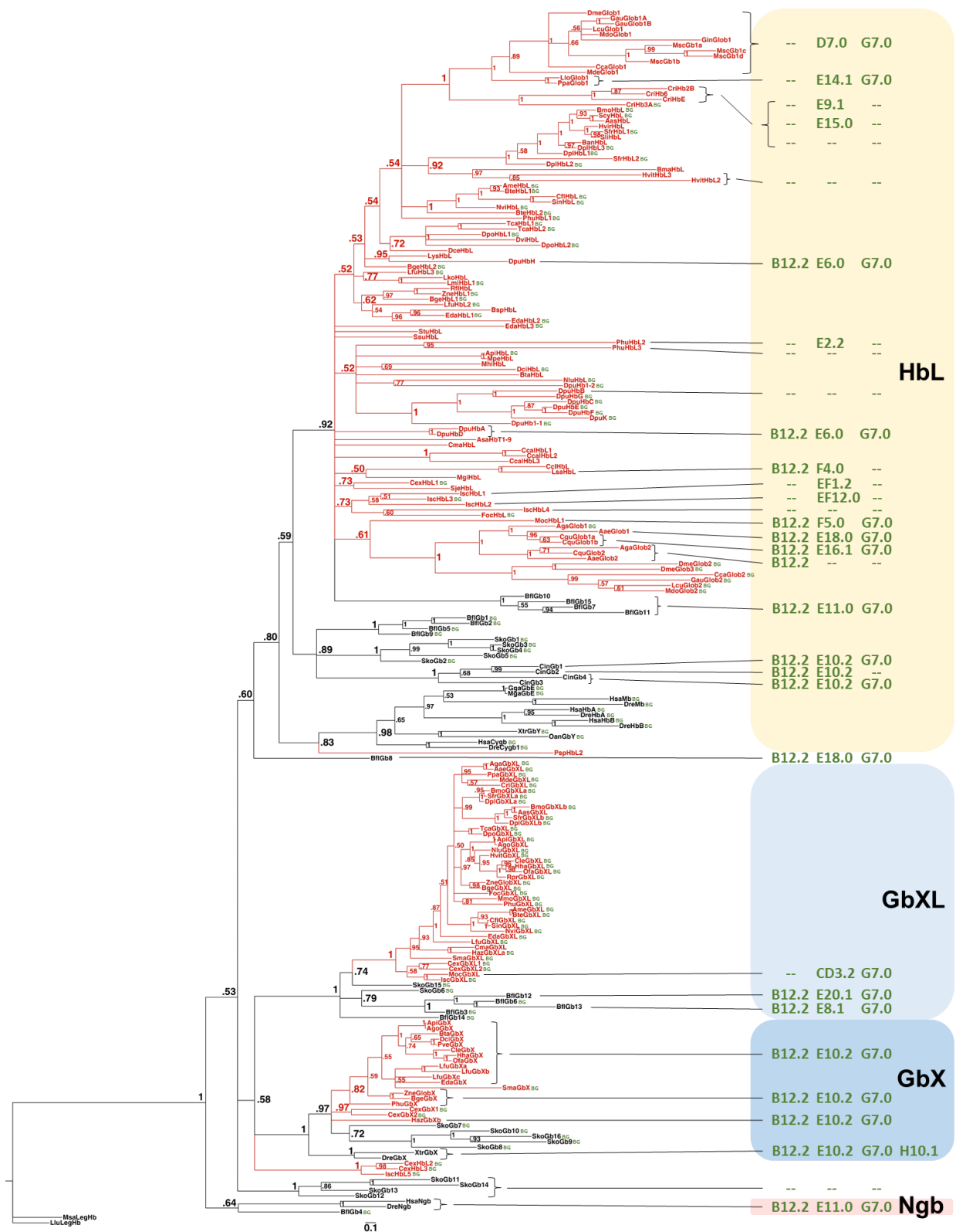
*PDB code	**Z-score
glob = average profile of 41 globins	Recommended cutoff : ZSCORE >= 6.0 (CERTAIN 99% confidence)
hs3mvca = Caenorhabditis elegans globin 6	Other cutoff : ZSCORE >= 4.0 (LIKELY 95% confidence)
hs1h97a = Paramphistomum epiclitum globin 3	Other cutoff : ZSCORE >= 3.5 (MARGINAL 90% confidence)
Bac_globin = Protozoan/cyanobacterial globin	Other cutoff : ZSCORE >= 2.0 (GUESS 50% confidence)
hs4bjaa = Caenorhabditis elegans globin 12	Other cutoff : ZSCORE < 2.0 (UNCERTAIN)

Supplemental Table 2. Results of RNA-Seq analyses

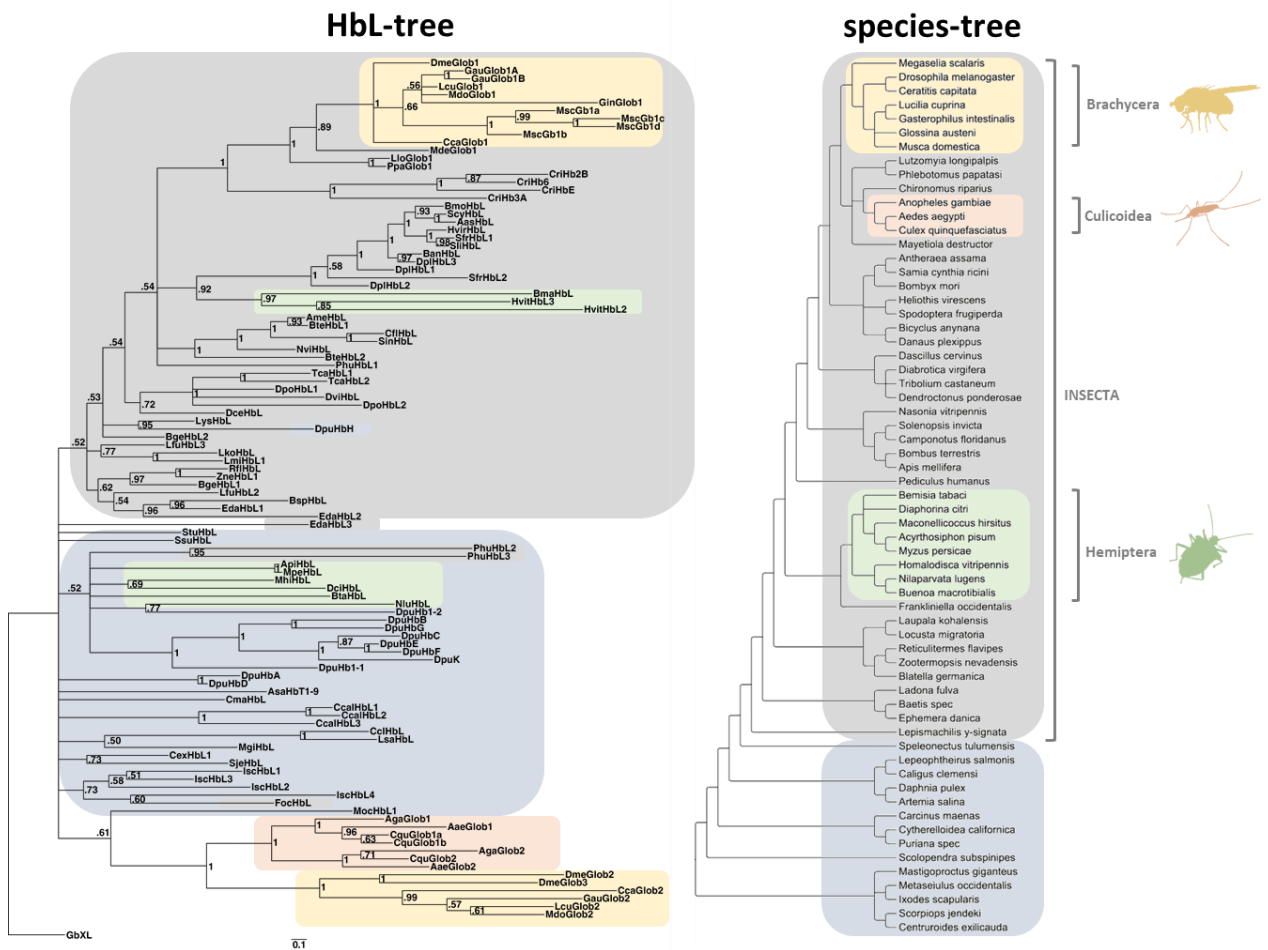
accession number	sequencing technique	tissue	reads before editing	reads after editing	mapped reads (%)	RPKM GbXL
SRX025530	454 GS FLX	embryo	1.136.885	1.104.287	84,44%	5,85
SRX025533	454 GS FLX	larvae	1.088.688	1.050.014	91,15%	0
SRX025527	454 GS FLX	adult	418.025	398.065	42,13%	0
SRX025528	454 GS FLX	abdomen	622.279	613.795	68,88%	0
SRX025529	454 GS FLX	antennae	1.135.230	1.116.158	88,23%	3,88
SRX025532	454 GS FLX	testes	1.317.973	1.278.705	88,99%	1,92
SRX016658	454 GS FLX	queen ovary	1.357.383	1.352.855	80,21%	1
SRX025531	454 GS FLX	brain& ovary	1.556.239	1.374.997	70,62%	18,53
SRX030492	Illumina Genome Analyzer II	forager brain 1	15.738.118	14.393.600	74,09%	57,67
SRX030493	Illumina Genome Analyzer II	forager brain 2	14.679.014	13.475.546	74,11%	46,63
SRX030494	Illumina Genome Analyzer II	forager brain 3	13.917.711	12.744.741	73,12%	34,46
SRX030495	Illumina Genome Analyzer II	forager brain 4	25.440.947	23.246.199	73,99%	64,82
SRX030496	Illumina Genome Analyzer II	forager brain 5	28.566.976	26.043.856	73,88%	56,7
SRX030487	Illumina Genome Analyzer II	nurse brain 1	9.912.179	9.075.465	74,30%	48,84
SRX030488	Illumina Genome Analyzer II	nurse brain 2	30.680.546	27.869.494	75,25%	16,93
SRX030489	Illumina Genome Analyzer II	nurse brain 3	16.911.515	15.452.828	74,39%	42,41
SRX030490	Illumina Genome Analyzer II	nurse brain 4	14.514.311	13.292.947	74,88%	39,33
SRX030491	Illumina Genome Analyzer II	nurse brain 5	11.451.917	10.487.496	68,87%	52,39



Supplemental Fig. 3. Amino acid alignment of the rearranged globin domains of androglobin (Adgb) from mouse and hexapods. Residues with high similarity are colored (dark green: 100% similar, light green: 80 to 100% similar, yellow: 60 to 80% similar; Blosum62). Numbering of residues is taken from Hoogewijs et al. 2012.



Supplemental Fig. 4. Distribution of intron positions in arthropod (red) and deuterostome (black) globin genes. A green “BG” behind the gene name marks globins with the typical introns at positions B12.2 and G7.0.



Supplemental Fig. 5. Comparison of the Bayesian arthropod HbL gene tree (left) and arthropod species phylogeny (Misof et al. 2014). Note the divergent position of globin genes from Hemiptera and Diptera, arguing for fast sequence evolution and possible functional change.

3.2 Funktionelle Analyse der Globine in *Drosophila melanogaster*

Ein Beispiel für die hohe funktionelle Variabilität innerhalb der HbL-Gruppe sind die drei Globine des Modellorganismus *Drosophila melanogaster*, was bereits durch die unterschiedlichen Expressionsorte ersichtlich wird. Während Glob1 hauptsächlich in den Tracheen und dem Fettkörper exprimiert wird, ist die Transkription von Glob2 und 3 ausschließlich auf die Testes beschränkt (Hankeln et al. 2002; Gleixner et al. 2012). Gerade letztere scheinen daher eine sehr spezialisierte Funktion erhalten zu haben, die aber bislang unbekannt ist und im Folgenden genauer untersucht werden sollte.

3.2.1 Analyse der Testes-spezifischen Proteine Glob2 und Glob3

3.2.1.1 Herstellung von Antikörpern gegen Glob2 und Glob3

Zur funktionellen Analyse der Testes-Globine von *Drosophila melanogaster* sollten zunächst gegen Glob2 und Glob3 gerichtete polyklonale Antikörper hergestellt werden. Hierfür wurden für beide Globine jeweils drei Kaninchen mit einem spezifischen Peptid immunisiert. Nach 150 Tagen wurde den Tieren Blut entnommen und die Antiseren aufgereinigt.

Um die Antikörper zu testen, wurden unter anderem Proteinextrakte aus Fliegen verwendet, die eine ubiquitäre Überexpression von Glob2 (Gb2-3'myc x daGal4) bzw. Glob3 (Gb3-5'myc x daGal4) aufwiesen (siehe Kap. 3.3.2.). Die exogenen Globine waren dabei mit einem myc-Tag gekoppelt, wodurch sie als Positivkontrolle mit Hilfe eines Anti-myc Antikörpers im Western-Blot nachgewiesen werden konnten. Das myc-Tag führte außerdem dazu, dass diese rekombinanten Globine ein um ca. acht kDa höheres Molekulargewicht als die endogenen Globine 2 und 3 aufwiesen. Auf einem Western-Blot mit Proteinextrakten von transgenen Männchen sollten nach Behandlung mit einem entsprechenden Globin-Antikörper daher zwei distinkte Banden zu sehen sein: eine Bande des endogenen Globins auf Höhe von 26 kDa und eine Bande des rekombinanten, myc-gekoppelten Globins auf Höhe von etwa 34 kDa.

Für Glob3 konnte kein Antikörper mit ausreichender Spezifität gewonnen werden (nicht gezeigt). Für Glob2 war dagegen die Herstellung eines funktionierenden Antikörpers

Ergebnisse

erfolgreich. Bei der Verwendung von Proteinen aus Testes für einen Western-Blot konnte das endogene Glob2 deutlich nachgewiesen werden (Abbildung 3-1, 1 und 2, roter Pfeil). Vor allem bei Testes-Proteinen des Wildtyp-Stammes Oregon-R lieferte der Antikörper dabei ein sehr spezifisches Signal. Auch das rekombinante Glob2 wird in den Testes der Überexpressionsfliegen eindeutig detektiert (Abbildung 3-1, 1, grüner Pfeil). Die Identität dieser Bande wurde zusätzlich mit einem gegen das myc-Tag gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abbildung 3-1, M, grüner Pfeil).

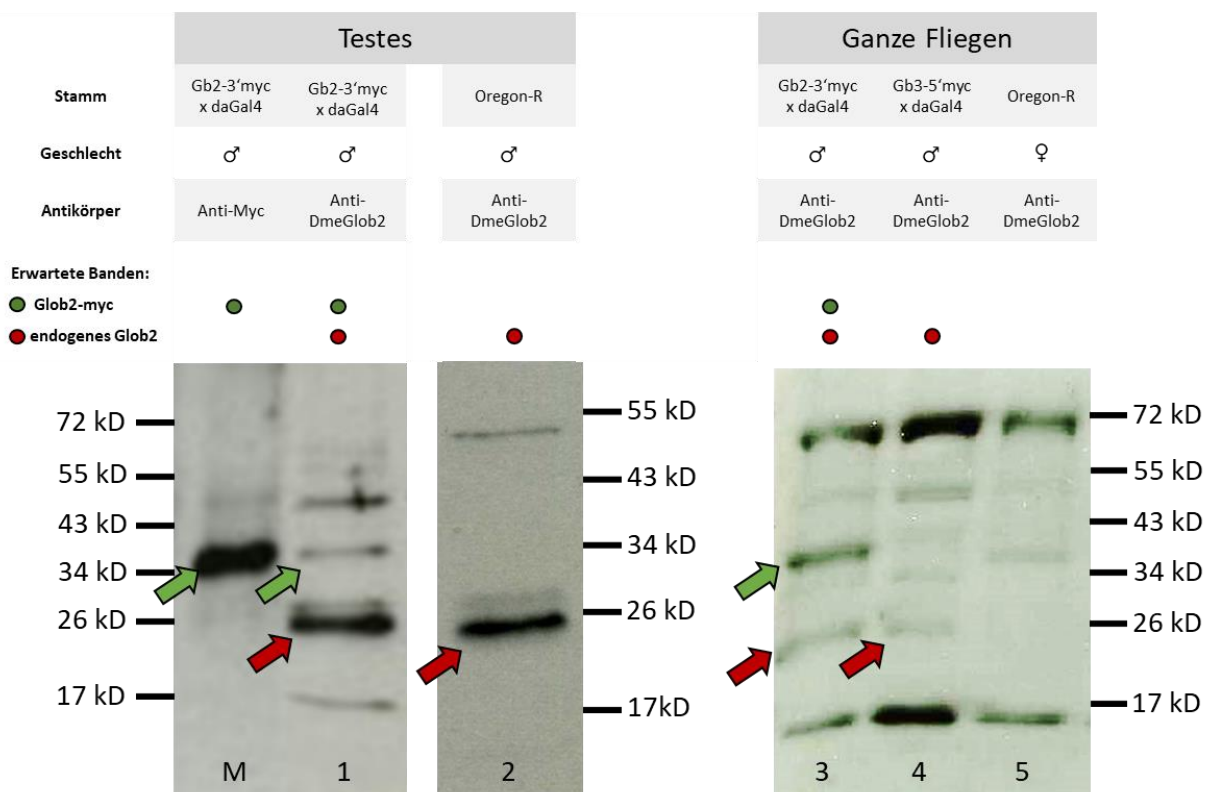


Abbildung 3-1. Western-Blot mit Anti-Glob2-Antikörper bzw. Anti-Myc-Antikörper an Proteinextrakten aus Testes und ganzen Fliegen. Die Behandlung mit dem Anti-Glob2-Antikörper führt bei allen Proteinextrakten aus Männchen zur Detektion des endogenen Glob2 auf Höhe von 26 kD (rote Pfeile). Bei Extrakten aus Fliegen mit Überexpression von Glob2 wird zusätzlich das exogene Glob2 auf Höhe von 34 kD detektiert (grüne Pfeile). Es wurden jeweils 50 µg Proteinextrakt aufgetragen und der Antikörper 1:200 in PBST verdünnt.

1-5: Proteinextrakte behandelt mit Anti-Glob2-Antikörper. 1: Testes von Männchen der Glob2-Überexpressions-Kreuzung *Glob2-3'myc x daGal4*; 2: Testes von Männchen des Wildtyp-Stammes Oregon-R; 3: Männchen der Glob2-Überexpressions-Kreuzung *Glob2-3'myc x daGal4*; 4: Männchen der Glob3-Überexpressionskreuzung *Glob3-5'myc x daGal4*; 5: Weibchen des Wildtyp-Stammes Oregon-R; M: Testes von Männchen der Glob2-Überexpressions-Kreuzung *Glob2-3'myc x daGal4* behandelt mit Anti-myc Antikörper.

Bei der Verwendung von Proteinextrakten ganzer Fliegen kam es dagegen zu deutlicheren unspezifischen Bindungen des Antikörpers an andere Proteine, auffallend sind dabei vor allem zwei starke Signale unbekannter Natur bei etwa 70 kDa und 17 kDa. Dennoch konnte Glob2 mit Hilfe des Antikörpers eindeutig detektiert werden. Das endogene Glob2 wird bei den Männchen auf der Höhe von 26 kDa detektiert (Abbildung 3-1, 3 und 4, roter Pfeil), während dieses Signal bei den Weibchen aufgrund der Testes-spezifischen Expression fehlt (Abbildung 3-1, 5). Zusätzlich bindet der Antikörper bei den Glob2-Überexpressionsfliegen erneut an das etwas größere transgene Glob2 (Abbildung 3-1, 3, grüner Pfeil). Bei Männchen mit überexprimiertem Glob3 und den Wildtyp-Weibchen fehlt dieses Signal dagegen erwartungsgemäß (Abbildung 3-1, 4 und 5).

3.2.1.2 Zelluläre Lokalisation von Glob2

Der hergestellte Antikörper konnte nun dafür verwendet werden, den Expressionsort des endogenen Glob2 innerhalb der Zelle genauer zu bestimmen. Dazu wurde eine subzelluläre Fraktionierung der Proteine von Männchen des Wildtyp-Stammes Oregon-R durchgeführt. Da die Fraktionierung von Testes-Gewebe aufgrund des zu geringen Volumens des gewonnenen Proteinextraktes nicht erfolgreich war, wurden für den Versuch die Abdomen männlicher Fliegen verwendet. Die Abdomen wurden homogenisiert, und durch mehrere Zentrifugationsschritte mit verschiedenen Extraktionspuffern wurden die Proteine aus einzelnen Zellkompartimenten voneinander getrennt. Nach vier Zentrifugationsschritten lagen die Proteinbestände des Cytosols, der Membranen, des Nukleus und die übrigen, meist cytoskelettalen Proteine vor. Die Proteinproben konnten anschließend mittels Western-Blot auf das Vorhandensein von Glob2 untersucht werden.

Um die korrekte Trennung der verschiedenen Fraktionen zu überprüfen, wurden die Proben zunächst mit Kontrollantikörpern getestet (Tabelle 3-1). Aktin und Tubulin sollten dabei vornehmlich im Cytoskelett und Cytosol lokalisiert sein. Aktin befindet sich aber auch im Nukleus, wo es unter anderem am mRNA-Transport und der Remodellierung des Chromatins beteiligt ist (Kristo et al. 2016; Bajusz et al. 2018). Histon H3 und GM130 sollten dagegen ausschließlich in der Nukleus- bzw. der Membranfraktion zu finden sein.

Tabelle 3-1. Antigene der verwendeten Kontrollantikörper.

Antigen	Molekulargewicht	erwartete Zellfraktion
β-Aktin	42 kDa	Cytosol / Nukleus / Cytoskelett
Histon H3	17 kDa	Nukleus
α-Tubulin	55 kDa	Cytosol / Cytoskelett
GM130	95 kDa	Membran (Golgi-Apparat)

Die Identität der einzelnen Zellfraktionen konnte durch die Kontrollantikörper weitestgehend bestätigt werden. Die Antikörper für β-Aktin, α-Tubulin und Histon H3 lieferten jeweils starke Banden auf der erwarteten Höhe und in den erwarteten Fraktionen (Abbildung 3-2). Einzig der Antikörper für die Membrankontrolle GM130 führte zu keinem spezifischen Signal (nicht gezeigt). Die Authentizität dieser Fraktion konnte daher nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Stattdessen zeigte der mit dem Aktin-Antikörper behandelte Blot eine zusätzliche unerwartete Bande in der Membranfraktion. Diese ist allerdings deutlich schwächer, als die übrigen Banden. Da außerdem die anderen Antikörper kein entsprechendes Signal aufwiesen, ist davon auszugehen, dass sich in der Membranfraktion kein relevanter Anteil an Proteinen anderer Fraktionen befindet.

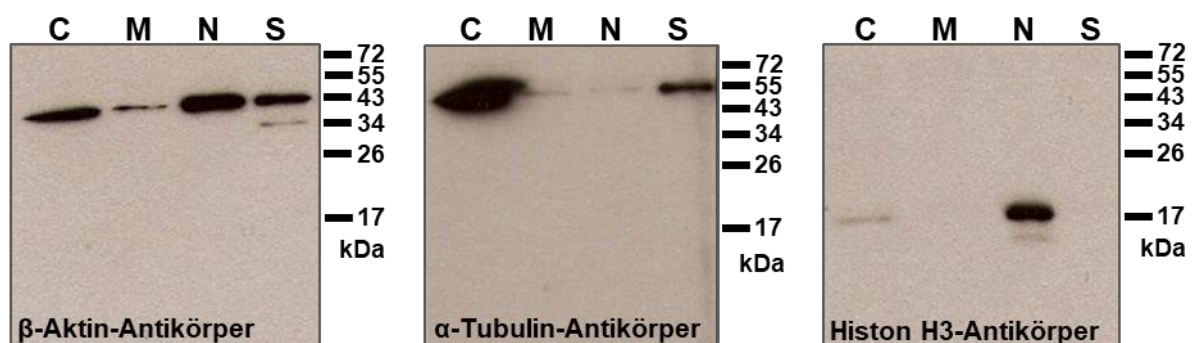


Abbildung 3-2. Kontrolle der einzelnen Zellfraktionen. Die Identität der verschiedenen Zellfraktionen konnte durch Kontrollantikörper weitestgehend bestätigt werden. C: Cytosol, M: Membran, N: Nukleus, S: Cytoskelett

Die folgende Behandlung mit dem Glob2-Antikörper zeigte trotz eines recht schwachen Signals, dass sich Glob2 wohl primär im Cytosol der Zelle befindet (Abbildung 3-3). Auf der erwarteten Höhe für Glob2 ist zwar auch ein Signal in der Cytoskelett-Fraktion zu sehen, diese Bande ist allerdings sehr viel schwächer. Zudem konnte in einer Untersuchung gezeigt werden, dass die Authentizität der Cytoskelett-Fraktion bei der hier angewendeten Methode am unsichersten ist, da es leicht dazu kommen kann, dass sich unvollständig fraktionierte Proteine aus den anderen Zellkompartimenten hier ansammeln. Dagegen weist vor allem die Cytosol- und die Nukleusfraktion ein sehr hohes Maß an korrekt fraktionierten Proteinen auf (Rockstroh et al. 2011). Dies spricht dafür, dass es sich bei Glob2 tatsächlich um ein im Cytosol lokalisiertes Protein handelt.

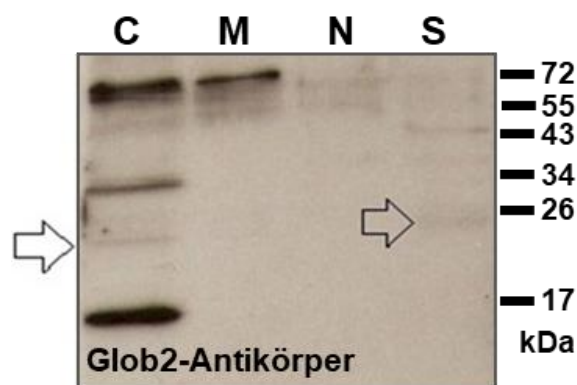


Abbildung 3-3. Nachweis der zellulären Lokalisation von Glob2. Glob2 ist primär im Cytosol lokalisiert. Eine zusätzliche, sehr schwache Bande ist in der Cytoskelett-Fraktion zu finden. C: Cytosol, M: Membran, N: Nukleus, S: Cytoskelett

3.2.2 Charakterisierung von Fliegen mit erhöhter Expression von Glob2 und Glob3

3.2.2.1 Ubiquitäre Überexpression von Glob2 und Glob3

Im Vorfeld dieser Arbeit konnten im Rahmen der Diplomarbeit von Eva Schweikert (2009) erfolgreich transgene Fliegen mit integrierten UAS-Globin-Konstrukten hergestellt werden, die mittels des UAS-Gal4-Systems nach Kreuzung mit der ubiquitär treibenden *daughterless*-Gal4 Linie (daGal4) eine erhöhte und ubiquitäre Expression von Glob2 bzw. Glob3 aufwiesen (Abbildung 3-4). Zum besseren Nachweis der rekombinanten Globine waren diese jeweils am 3'- oder am 5'-Ende mit einem myc-Tag versehen. Insgesamt standen drei funktionelle

Überexpressionsstämme zur weiteren Analyse zur Verfügung: zwei Glob2-UAS-Stämme (Glob2-3'myc und Glob2-5'myc) und ein Glob3-UAS-Stamm (Glob3-5'myc).

Durch qRT-PCR wurde gezeigt, dass nach Kreuzung dieser UAS-Stämme mit dem Treiberstamm daGal4, die RNA-Expression von Glob2, bzw. Glob3 in den Testes der Männchen um etwa 100% erhöht ist (Abbildung 3-4, A). Hierfür wurden zwei verschiedene Primer-Kombinationen verwendet. Bei einem Primerpaar wurde ein etwa 140 bp langer Abschnitt der Globin-CDS amplifiziert und so die gesamte Expression des jeweiligen Globins quantifiziert. Bei der zweiten Primerkombination lag ein Primer innerhalb des myc-Tags, sodass dadurch nur das rekombinante Globin amplifiziert wurde. Durch die Differenz konnten so die relativen Anteile der endogenen und transgenen Globin-Expression errechnet werden (Schweikert 2009).

Mittels eines gegen das myc-Tag gerichteten Antikörpers konnte die Überexpression auch auf Proteinebene eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 3-4 B). Durch das myc-Tag erhöht sich das Molekulargewicht der eigentlich etwa 26 kDa großen Proteine, die deshalb auf dem Western-Blot auf einer Höhe von etwas über 34 kDa sichtbar werden.

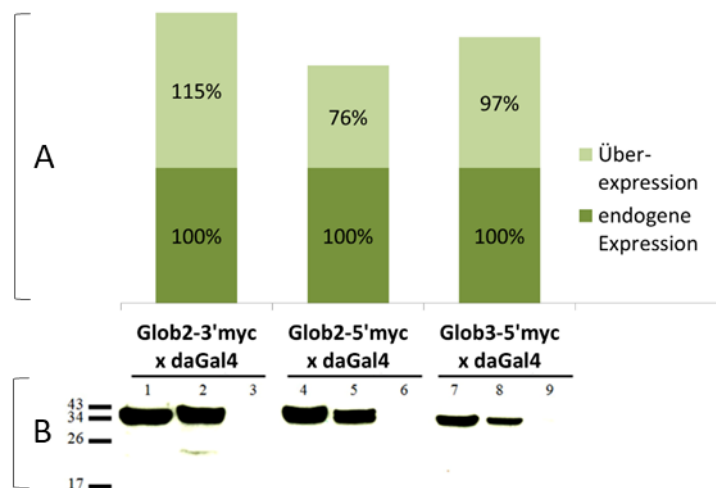


Abbildung 3-4. Nachweis der Globin-Überexpression in doppeltransgenen Kreuzungsnachkommen. (A) Quantitativer RNA-Nachweis von endogenem, sowie transgenem Glob2 und 3 in den Testes mittels qRT-PCR. (B) Qualitativer Protein-Nachweis von transgenem Glob2 und 3 in ganzen Fliegen und Testes mittels Western-Blot mit Anti-myc-Antikörper. 1, 4, 7: Protein aus doppeltransgenen ganzen Fliegen. 2, 5, 8: Protein aus den Testes doppeltransgener Fliegen. 3, 6, 9: Protein aus ganzen Fliegen des UAS-Elternstammes als Negativkontrolle. (verändert nach Schweikert 2009)

Eine Quantifizierung der rekombinanten Proteinmenge im Vergleich zu den endogenen Globinen war im Rahmen der Diplomarbeit jedoch noch nicht möglich, da die hierzu benötigten, gegen die natürlichen Globine gerichteten Antikörper nicht vorhanden waren. Ob die Verdopplung der Globin-mRNA in den Testes der transgenen Tiere auch zu der doppelten Menge an Protein führt, konnte daher noch nicht beantwortet werden.

3.2.2.2 Vergleich der Glob2-Überexpression auf RNA- und Protein-Ebene

Durch den neu hergestellten Anti-Glob2-Antikörper konnte nun auch versucht werden, die Expression des transgenen Glob2-Proteins relativ zur endogenen Glob2-Expression zu quantifizieren. Dies wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Daniel Boness (2011) durchgeführt. Hierfür wurde ein sensitiveres Western-Blot-System verwendet: Die aufgetrennten Proteinextrakte wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und die fertigen Blots zur Auswertung mit einem Molecular Imager FX System (Biorad, München) gescannt. Da das rekombinante Glob2 aufgrund des myc-Tags ein höheres Molekulargewicht (34 kDa gegenüber 26 kDa) aufweist, können die somit getrennt identifizierbaren Banden des endogenen und des transgenen Glob2 direkt miteinander verglichen werden. In den dissektierten Testes konnte allerdings nur eine schwache Bande des transgenen myc-Glob2 detektiert werden, die sich nicht quantifizieren ließ (nicht gezeigt). Dies deckt sich mit dem Ergebnis des vorangegangenen Western-Blots zum Test der Antikörper: auch hier erzeugte das myc-gekoppelte Glob2 in den Testes ein deutlich schwächeres Signal, als das endogene Glob2 (Abbildung 3-1; Spur 1). Auf der Proteinebene scheint somit das Verhältnis von transgenem zu endogenem Globin in den Testes deutlich kleiner zu sein als auf RNA-Ebene, wo die Menge an Glob2-RNA durch die Überexpression verdoppelt wird (Abbildung 3-4A).

Der Vergleich der Glob2-Überexpression auf RNA- und Proteinebene wurde daher anschließend in ganzen männlichen Fliegen durchgeführt. Zunächst wurde die RNA-Überexpression von myc-Glob2 in ganzen Männchen mittels qRT-PCR gemessen. Hierfür wurden dieselben Primerpaare verwendet, die auch für die Quantifizierung in den Testes verwendet worden waren (siehe Kap. 3.2.2.1). Es konnte dadurch gezeigt werden, dass die Menge an gesamter Glob2-RNA durch die Expression des transgenen Globins in ganzen Männchen beider Überexpressions-Stämme um etwa 200% erhöht ist (Abbildung 3-5).

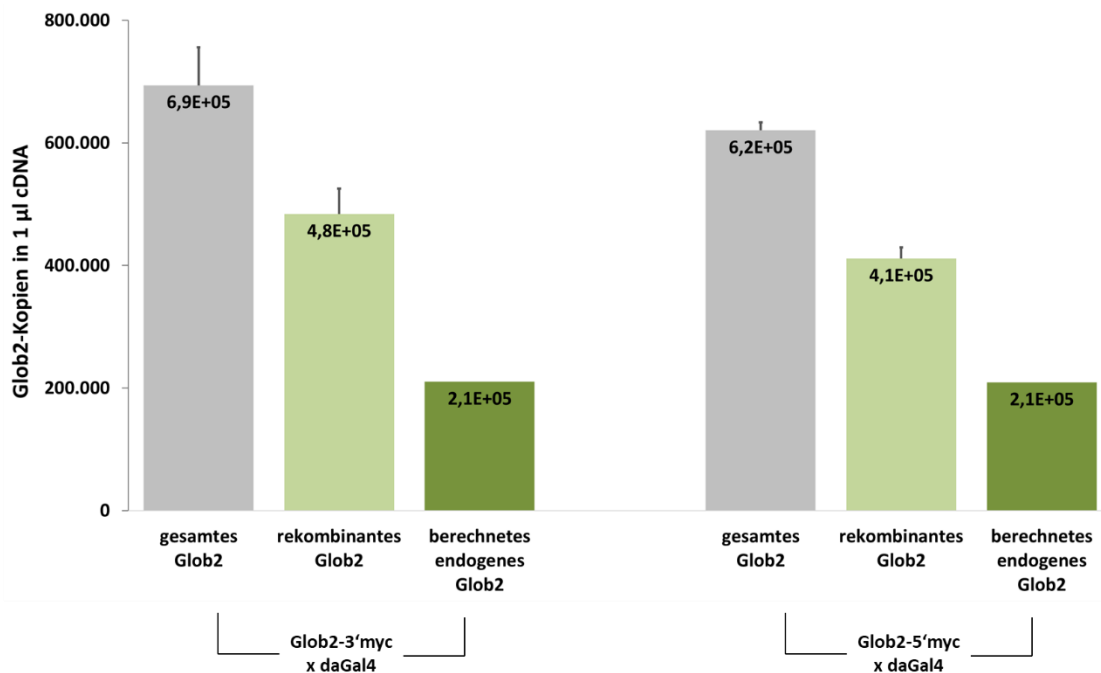


Abbildung 3-5. Quantifizierung der gesamten Glob2-mRNA sowie des separat gemessenen transgenen myc-Glob2 in ganzen Männchen mittels qRT-PCR. Die Menge an mRNA-Kopien des transgenen Glob2 entspricht in beiden Glob2-Überexpressions-Stämmen etwa der doppelten Menge an errechneter mRNA des endogenen Glob2.

Anschließend wurden die Proteine aus ganzen Männchen der beiden Glob2-Überexpression-Kreuzungen extrahiert und mittels Western-Blot unter Verwendung des Anti-Glob2 Antikörpers die Menge an endogenen und rekombinanten Glob2-Proteinen verglichen. Da der Anti-Glob2 Antikörper bei Proteinextrakten aus ganzen Fliegen mehrere unspezifische Banden verursacht (vgl. Kap. 3.2.1.1), wurden zur Identifizierung der korrekten Banden Kontrollen mitgeführt. Zum einen konnte so durch einen Anti-myc Antikörper das auf Höhe von 34 kDa laufende rekombinante Glob2 nachgewiesen werden. Zum anderen wurden Testes-Proteine des Wildtyp-Stammes Oregon-R mit dem Anti-Glob2-Antikörper behandelt, um das endogene Glob2 auf Höhe von 26 kDa zu identifizieren (Abbildung 3-6 A).

Beim Blot mit den Proteinen ganzer Männchen zeigten sich deutlichere Banden des myc-gekoppelten Glob2, als in dem vorherigen Versuch mit Testesproteinen. Die Quantifizierung ergab hier bei beiden Kreuzungen eine transgene Proteinmenge, die der Menge des endogenen Glob2 entspricht. Die Expression von Glob2 ist somit in den überexprimierenden Fliegenstämmen auf Proteinebene um etwa 100% erhöht (Abbildung 3-6).

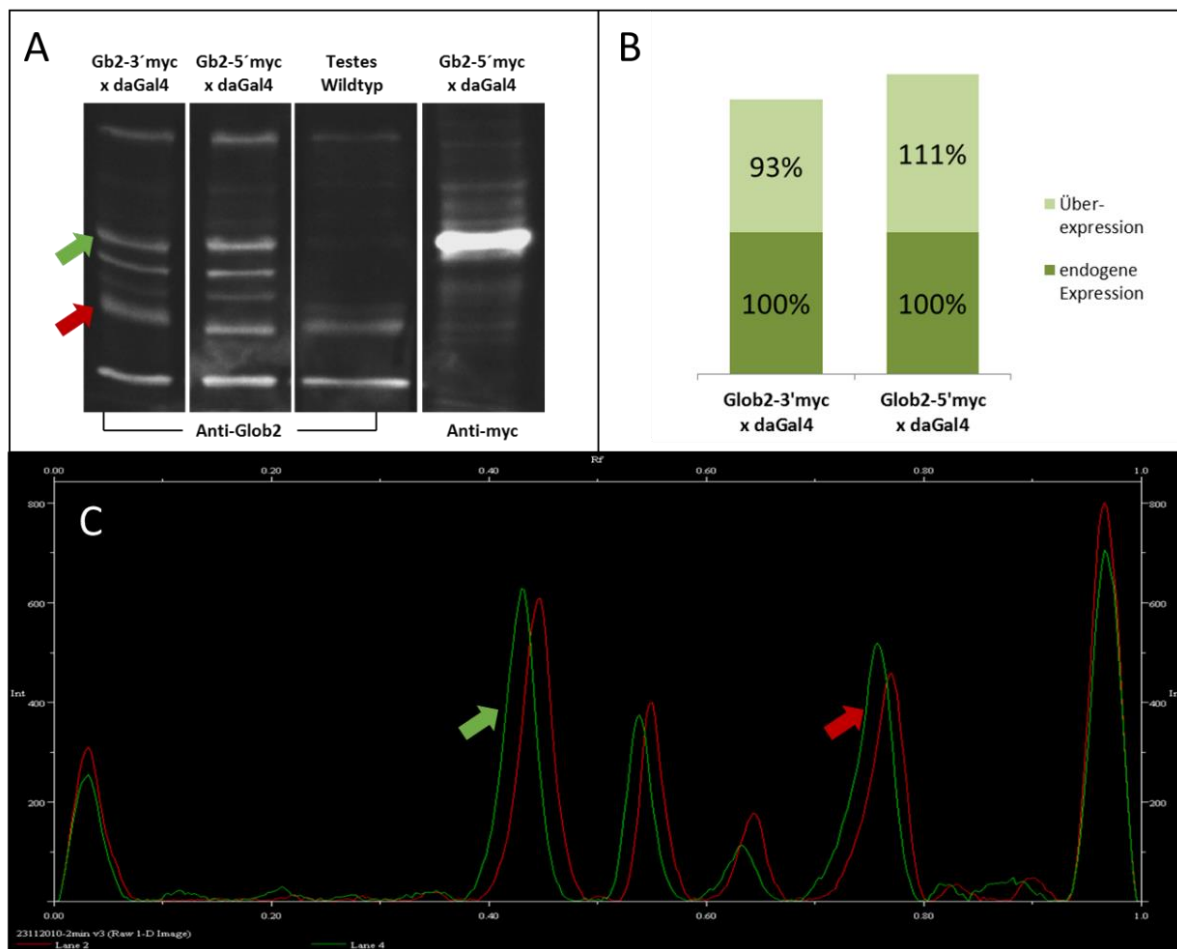


Abbildung 3-6. Die Quantifizierung der Glob2-Expression auf Protein-Ebene weist eine Verdopplung der Glob2-Proteinmenge in ganzen Männchen beider Glob2-Überexpressionskreuzungen nach. A: Western-Blot. Der grüne Pfeil markiert die Bande des transgenen Glob2, der rote Pfeil die Bande des endogenen Glob2. Zur Bestätigung der jeweiligen Banden wurden Testes-Proteine des Wildtyp-Stammes Oregon-R mit Anti-Glob2-Antikörper und Proteinextrakte aus ganzen Fliegen der Kreuzung Gb2-5'myc x daGal4 mit Anti-myc-Antikörper behandelt. B: Ergebnis der Quantifizierung. C: Screenshot der Auswertungssoftware Quantity One. Die beiden Graphen geben die Intensität der Banden der Überexpressionskreuzung Gb2-5'myc x daGal4 wieder. Die Quantifizierung wurde mit zwei verschiedenen Antikörper-Konzentrationen durchgeführt (grüner, bzw. roter Graph). Der grüne Pfeil markiert das Signal der Bande des überexprimierten Globins, der rote Pfeil das Signal der endogenen Globin-Bande.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auch in ganzen Fliegen die Überexpression auf RNA-Ebene höher zu sein scheint, als auf Protein-Ebene (Abbildung 3-7). Aber auch auf Protein-Ebene weisen die transgenen Fliegen mit der Verdopplung ihrer Glob2-Proteinmenge eine deutliche Überexpression auf. Insgesamt zeigt die Analyse, dass die doppeltransgenen Fliegen vor allem außerhalb der Testes eine deutlich erhöhte Globinmenge besitzen und somit für phänotypische Analysen zur Ermittlung der Auswirkungen dieser Globine im ektopischen

Kontext verwendet werden können. Die relative Stärke der Proteinexpression von transgenem Glob3 in den Glob3-Überexpressionsfliegen konnte aufgrund des Fehlens eines spezifischen Antikörpers gegen Glob3 nicht quantifiziert werden. Der qualitative Nachweis von transgenem Glob3-Protein durch Anti-myc-Antikörper und die vergleichbare Stärke der Überexpression auf mRNA-Ebene, lassen aber vermuten, dass auch die Menge an Glob3-Proteinen in diesen Fliegen in ähnlichem Maße erhöht ist, wie die von Glob2 in den Glob2-Überexpressionsfliegen. Daher wurden auch die Fliegen mit transgener Glob3-Expression für die phänotypischen Analysen verwendet.

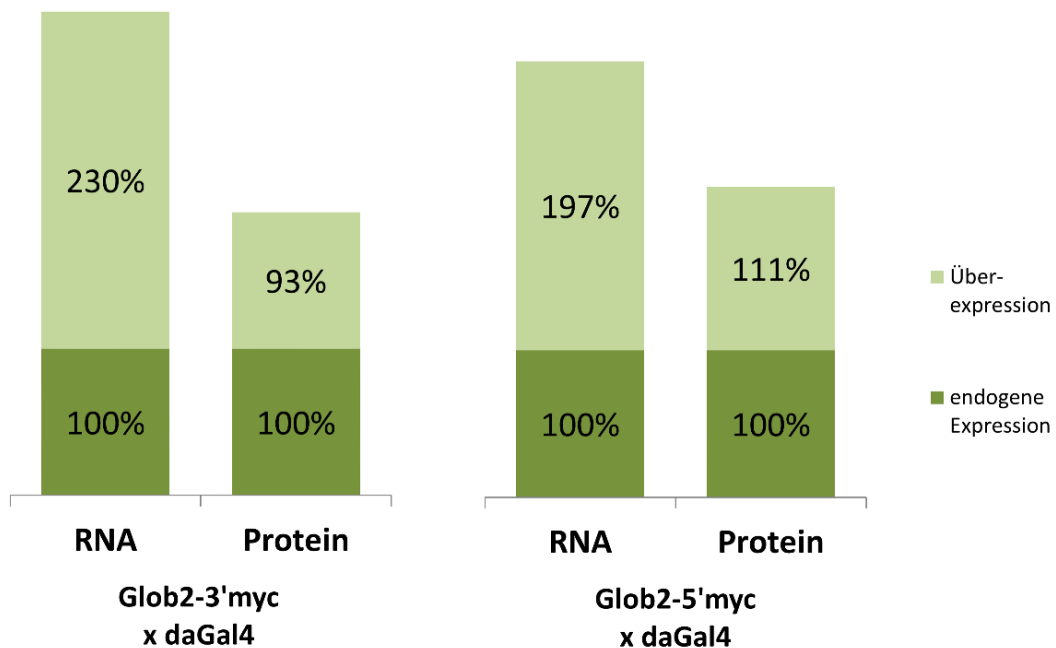


Abbildung 3-7. Zusammenfassung der Quantifizierungsergebnisse der Glob2-Expression in ganzen Männchen auf RNA- und Protein-Ebene. In beiden Glob2-Überexpressionskreuzungen ist die Überexpression auf der RNA-Ebene höher als auf Protein-Ebene.

3.2.2.3 Phänotypischer Einfluss einer erhöhten Expression von Glob2 und 3 auf das Überleben unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Lebensdauer unter Normoxie

Um den Einfluss der erhöhten ubiquitären Globin-Expression zu untersuchen, wurde zunächst die Lebensdauer der verschiedenen Kreuzungen mit Überexpression von Glob2 bzw. Glob3 unter normoxischen Bedingungen gemessen. Als Kontrollen wurden jeweils Kreuzungen zwischen einem der beiden Elternstämme mit dem jeweiligen Hintergrund des anderen Elternstammes verwendet. Das heißt, die Globin-UAS-Stämme wurden jeweils mit white⁻, dem Hintergrund des Treiberstammes daGal4, und der Treiberstamm wiederum mit LLA11, dem Hintergrund der Globin-UAS-Stämme, gekreuzt. Es wurden von jedem Stamm und Geschlecht jeweils die gleiche Anzahl an Fliegen in einem Zuchtröhrchen gehalten. Pro Woche wurden die Fliegen zweimal in ein neues Röhrchen überführt und die toten Fliegen gezählt. In vier Durchläufen wurde so die Lebensdauer von insgesamt jeweils 245 Fliegen pro Stamm und Geschlecht ermittelt. Da die Stichproben der verschiedenen Stämme keine Normalverteilung aufwiesen, wurden zur statistischen Beurteilung jeweils zwei Stichproben durch einen Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen.

Bei allen Stämmen zeigte sich eine längere Überlebensdauer der weiblichen Fliegen gegenüber den Männchen. Allerdings war sowohl innerhalb der Männchen, als auch innerhalb der Weibchen kein Unterschied zwischen den Fliegen mit erhöhter ektopischer Expression von Glob2 bzw. Glob3 und den Kontrollen zu erkennen (Abbildung 3-8). Nur die Weibchen der Kontrolle LLA11 x daGal4 zeigten eine signifikant reduzierte Lebensdauer im Vergleich zu den Glob2-Kreuzungen. Dieser Unterschied bestand allerdings sowohl zu den Fliegen mit Glob2-Überexpression, als auch zu den Glob2-Kontrollkreuzungen und kann daher nicht auf die unterschiedliche Expression von Glob2 zurückgeführt werden. Die Überexpression von Glob2 und Glob3 scheint daher keinen Einfluss auf die Lebensdauer der Fliegen unter normoxischen Bedingungen zu haben.

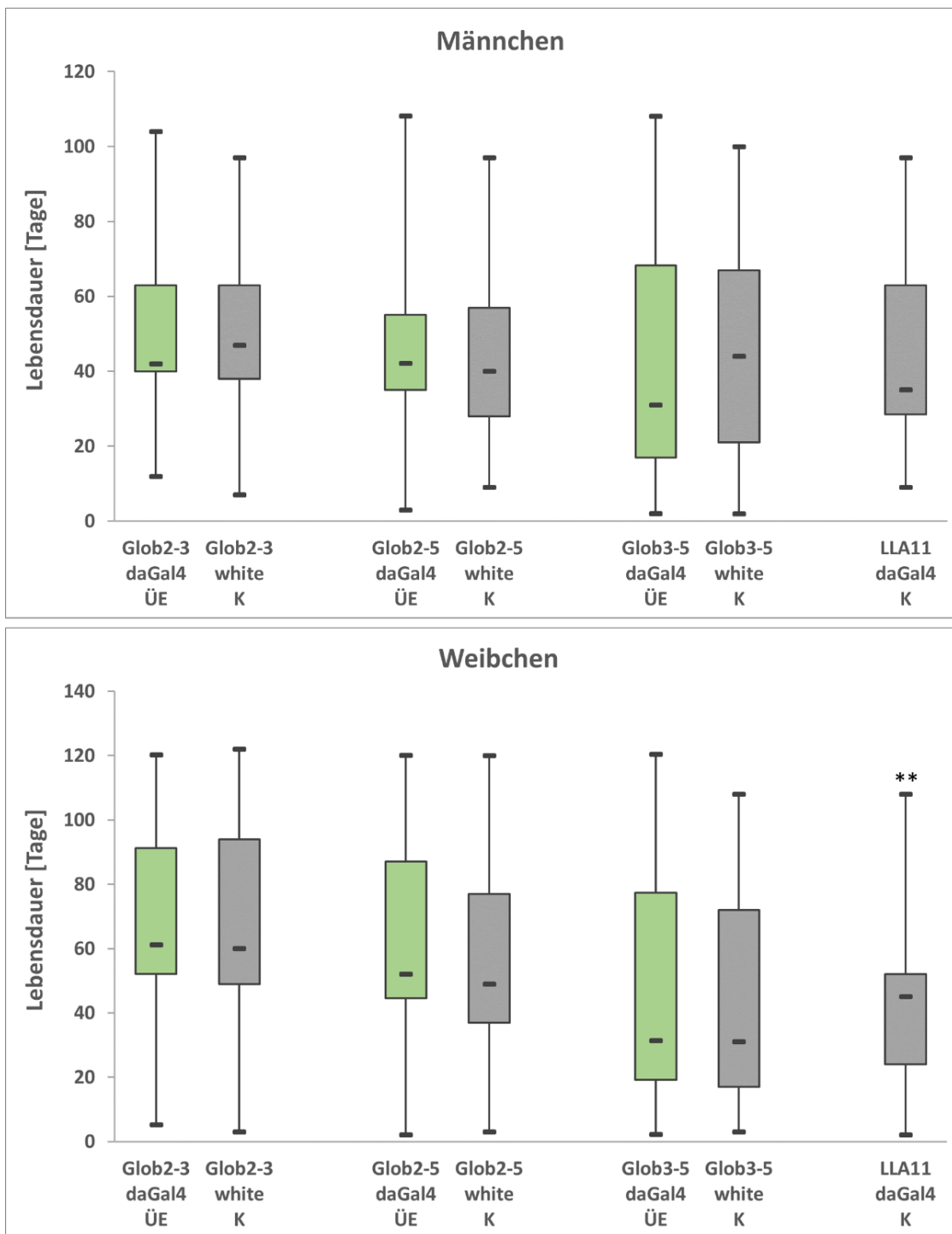


Abbildung 3-8. Lebensdauer unter Normoxie. Die Globin-Überexpression wirkt sich nicht auf die Lebensdauer der Fliegen aus. Die Boxen umfassen die Werte des zweiten und dritten Quartils. Zusätzlich ist der Maximalwert, der Minimalwert und der Median angegeben. ÜE: Überexpressionskreuzungen; K: Kontrollkreuzungen. Signifikanz nach Mann-Whitney-U-Test: **= $p < 0,01$

Lebensdauer unter Hyperoxie

Falls Glob2 und 3 irgendeine Rolle im Atmungsstoffwechsel in Zusammenhang mit Sauerstoff oder reaktiven Sauerstoffspezies spielen sollten, wirkt sich die ektopische Expression von Glob2 bzw. Glob3 möglicherweise erst unter extremen Sauerstoffbedingungen aus. Daher wurde als nächstes die Überlebensdauer der verschiedenen Stämme unter erhöhter Sauerstoffkonzentration getestet. Hierfür wurden pro Stamm jeweils 50 Männchen und Weibchen in einem Röhrchen bei 95% Sauerstoff gehalten. Zweimal am Tag wurden die Fliegen in frische Zuchtröhrchen gegeben und die gestorbenen Fliegen gezählt. Bedingt durch das hierfür notwendige Öffnen der Sauerstoffkammer, sank der Sauerstoffgehalt innerhalb der Kammer jeweils kurzzeitig auf etwa 70% ab. Als Kontrollen wurden wieder beide Elternstämme der Glob2/3-Überexpressions-Kreuzungen mit dem Hintergrund des jeweils anderen Elternstammes gekreuzt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und somit pro Stamm und Geschlecht jeweils 150 Fliegen untersucht. Die Fliegen mit Glob3-Überexpression konnten aus technischen Gründen nur im dritten Durchgang getestet werden, weshalb die Stichprobe hier nur aus 50 Fliegen bestand.

Die hohe Sauerstoffkonzentration führte zu einer deutlich verkürzten Lebensdauer der Fliegen. Während die Fliegen unter Normoxie bis zu 120 Tage alt wurden, waren unter Hyperoxie bereits nach maximal neun Tagen alle Fliegen tot. Zudem zeigte sich auch ein klarer Unterschied zwischen den Überexpressionskreuzungen und den Kontrollen. Über alle Stämme hinweg lebten die Fliegen mit Globin-Überexpression im Durchschnitt 153 Stunden, die Kontroll-Fliegen dagegen nur 112 Stunden. Da die Stichproben erneut keine Normalverteilung aufwiesen, wurde auch hier jeweils ein paarweiser Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Fliegen mit einer Überexpression von Glob2 oder Glob3 wiesen dabei in allen Fällen eine signifikant höhere Überlebensdauer unter Hyperoxie auf, als ihre jeweiligen Kontrollen (Abbildung 3-9). Zwischen den Kontrollen zeigte sich dagegen kein Unterschied. Einzig die Kontrollkreuzung Gb3-5 x daGal4 wies vor allem bei den Männchen eine im Vergleich zu den anderen Kontrollen noch geringere Überlebensdauer auf. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass die erhöhte Globinexpression offensichtlich zu einer erhöhten Toleranz der Fliegen gegenüber Hyperoxie führt.

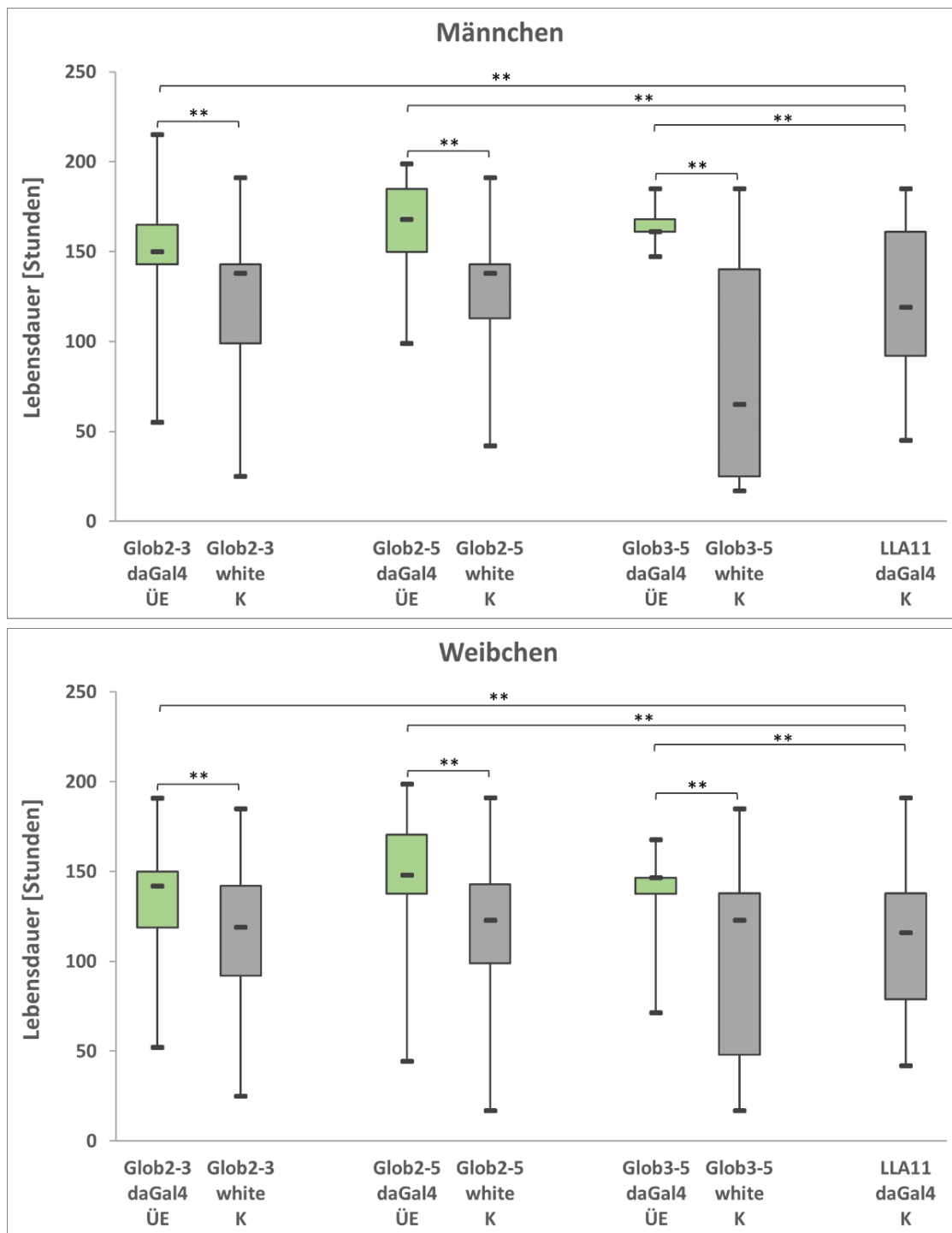


Abbildung 3-9. Lebensdauer unter Hyperoxie (O_2 -Gehalt = 95%). Die Fliegen mit Globin-Überexpression (grün) weisen in beiden Geschlechtern eine längere Lebensdauer gegenüber den Kontrollen (grau) auf. Die Boxen umfassen die Werte des zweiten und dritten Quartils. Zusätzlich ist der Maximalwert, der Minimalwert und der Median angegeben. ÜE: Überexpressionskreuzungen; K: Kontrollkreuzungen. Signifikanz nach Mann-Whitney-U-Test: **= $p < 0,01$

Überleben nach Hypoxie

Neben der Überlebensdauer der Fliegen unter Hyperoxie wurde auch die Toleranz gegenüber einem Mangel an Sauerstoff getestet. Unter stark hypoxischen Bedingungen fallen Fliegen unverzüglich in einen Stupor, können sich unter Normoxie aber oftmals wieder erholen (Csik 1940; Haddad et al. 1997). Um ein Verkleben im Futterbrei zu verhindern, wurden für die Hypoxie-Experimente daher leere Zuchtgefäße verwendet. Jeweils 30 Fliegen wurden pro Kreuzung und Geschlecht in die Zuchtgefäße gegeben. Nach sechs Stunden unter starker Hypoxie (1,5% O₂) und einer zweistündigen Erholungsphase unter normoxischen Bedingungen wurden die toten Fliegen ausgezählt. Als Kontrollen zu den Fliegen mit erhöhter Globin-Expression wurden wieder die Kreuzungen der Elternstämme mit dem jeweiligen Hintergrund des anderen Elternstammes verwendet. Der Versuch wurde viermal durchgeführt, die Ergebnisse wiesen allerdings große Schwankungen auf. So waren nach einem der Durchgänge nahezu alle Fliegen tot, während sich in anderen Experimenten fast alle Fliegen wieder erholen konnten (nicht gezeigt). Aufgrund der schweren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte daher durch diesen Versuch keine Aussage über den Einfluss der Überexpression von Glob2 und Glob3 auf die Toleranz der Fliegen gegenüber Hypoxie gemacht werden.

3.2.3 Charakterisierung von Fliegen mit transkriptionellem Knockdown von Glob3

3.2.3.1 Knockdown von Glob3

Im vorigen Kapitel konnten die Auswirkungen einer artifiziellen ubiquitären Expression der natürlicherweise nur in den Testes exprimierten Globine Glob2 und 3 untersucht werden. Ein weiteres Ziel war es nun, zu untersuchen, wie sich eine Reduzierung der natürlichen Globinexpression auf die Fliegen auswirkt. Für Glob3 standen hierfür drei verschiedene, öffentlich erhältliche Stämme zur Verfügung, bei denen der Grad der Genexpression zunächst mittels qRT-PCR getestet werden musste.

Zwei dieser Stämme (ID: 23520 und 17929; BDSC, Bloomington) besitzen jeweils im zweiten Intron des Glob3-Gens ein transposables Element (Abbildung 3-10). Bei den Transposons

handelt es sich um ein Minos- bzw. ein piggyBac-Element (Pavlopoulos et al. 2007; Yusa 2015). Beide Stämme sind mit einem drittschromosomalen Balancer-Chromosom ausgestattet, das ein intaktes Glob3-Gen trägt. Balancer sind Chromosomen mit multiplen Inversionen, um ein Crossing-over zwischen den homologen Chromosomen zu verhindern. Sie tragen zusätzlich homozygot letale Mutationen und dominante morphologische Marker. Durch diese Marker sind die für das Transposon heterozygoten Fliegen leicht von den homozygoten zu unterscheiden. Für das piggyBac-Element homozygote Fliegen traten allerdings nicht auf und sind daher offensichtlich nicht lebensfähig. Dies kann allerdings nicht allein auf einen Ausfall der Glob3-Expression zurückgeführt werden, da auch die weiblichen Fliegen, die ohnehin kein Glob3 exprimieren, nicht lebensfähig sind. Es ist aber prinzipiell möglich, dass die Transposons innerhalb des Glob3-Gens zu einer Störung oder sogar zu einem kompletten Ausfall der Glob3-Expression führen. Durch quantitative RT-PCR konnte auch ein entsprechender transkriptioneller Knockdown von Glob3 in Männchen nachgewiesen werden (Abbildung 3-11A). Die Männchen beider Transposon-Stämme wiesen eine um etwa 50% verringerte Expression von Glob3 im Vergleich zu den Männchen ihres Hintergrundstammes *white*⁻ auf. Sowohl zwischen den beiden Transposon-Stämmen, als auch zwischen Männchen, die hetero- bzw. homozygot für das Minos-Element sind, konnte kein signifikanter Unterschied in der Glob3-Expression gemessen werden (Abbildung 3-11A).

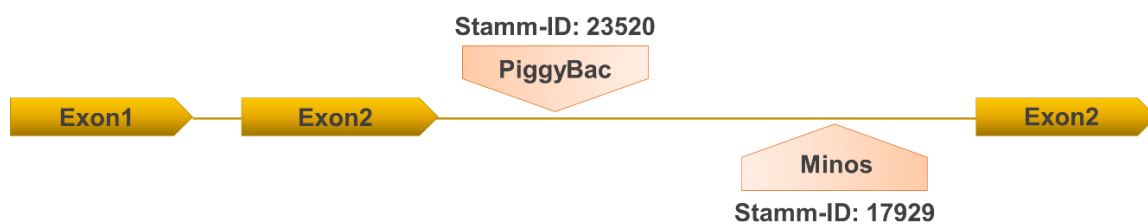


Abbildung 3-10. Positionierung der transposablen Elemente innerhalb des zweiten Introns des Glob3-Gens.

Zusätzlich konnte ein weiterer kommerziell erhältlicher Stamm (ID: 104904; VDRC; Wien) für einen Glob3-Knockdown durch RNA-Interferenz (RNAi) verwendet werden. Hierbei handelt es sich um einen UAS-Reporterstamm mit einem an das UAS-Element gekoppelten *hairpin*-Konstrukt eines Teiles der CDS von Glob3. Durch Kreuzung mit der Treiber-Linie *daGal4* konnte ein nahezu kompletter transkriptioneller Knockout von Glob3 erreicht werden (Abbildung

3-11B). Als Vergleich dienten jeweils Kreuzungen des UAS-RNAi-Stammes bzw. der daGal4-Linie mit dem Stamm white-, dem Hintergrund beider Stämme. Die Quantifizierung mittels qRT-PCR ergab, dass die Glob3-Expression in den Männchen mit RNAi-vermitteltem Knockdown nur etwa zwei Prozent der Expression in den Kontrollkreuzungen entsprach (Abbildung 3-11B).

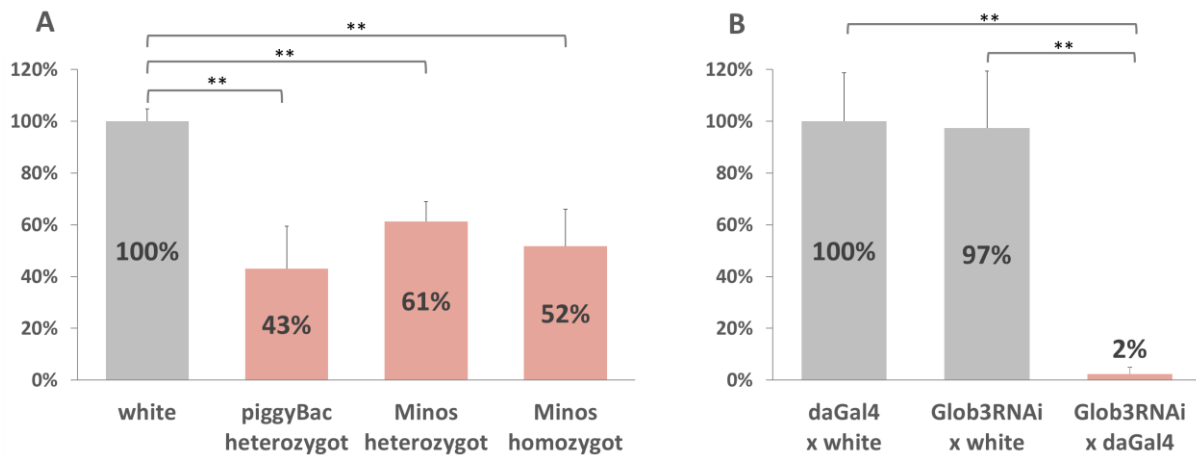


Abbildung 3-11. Quantifizierung der Glob3-Expression in Männchen der Stämme mit Glob3-Knockdown mittels qRT-PCR. Die Stämme mit Transposons (A) und vor allem die RNAi-Kreuzung (B) weisen eine deutliche Reduzierung der Glob3-Expression auf. Angegeben ist die relative Expression im Vergleich zu den Kontrollen. Die Fehlerbalken geben jeweils die Abweichungen zweier in Triplikaten gemessener biologischer Replikate an. Es wurde ein zweiseitiger T-Test durchgeführt (**= $p < 0,01$).

Es standen somit drei Stämme mit deutlich reduzierter Glob3-Expression zur Verfügung. Aufgrund der ausschließlichen Expression von Glob3 in den Testes und der deshalb vermuteten Funktion während der Spermatogenese wurden im Folgenden die Auswirkungen des Glob3-Knockdowns auf die Spermien und die Fertilität der Fliegen untersucht.

3.2.3.2 Analyse der Spermatogenese in Stämmen mit transkriptionellem Knockdown von Glob3

Ein erster Schritt zur morphologischen Analyse des Ablaufs der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* ist die mikroskopische Betrachtung von isolierten Testes im Phasenkontrast (White-Cooper 2004). Um direkt sichtbare Auswirkungen des Glob3-Knockdowns auf die Spermatogenese zu ermitteln, wurden daher die Testes von Fliegen der

drei Stämme mit Glob3-Knockdown sowie von Fliegen mit endogener Expression von Glob3 auf diese Weise dokumentiert.

Die Keimzellen wandern während ihrer Entwicklung von der apikalen Spitze der Testes weg und werden von neuen Spermatogonien verdrängt. Da die gesamte Spermatogenese von der Teilung der Urkeimzelle bis zu den fertigen Spermien zehn Tage dauert, aber alle zehn Stunden erneut gestartet wird (Castrillon et al. 1993), können die einzelnen Entwicklungsstadien gleichzeitig entlang der länglichen gewundenen Testes beobachten werden. Auch in den hier untersuchten Testes konnten die verschiedenen Stadien der Spermatogenese durch Phasenkontrastmikroskopie gut sichtbar gemacht werden (Abbildung 3-12). An der apikalen Spitze der Testes befinden sich fünf bis neun Urkeimzellen. Nach Teilung einer dieser Zellen verbleibt eine der Tochterzellen als Urkeimzelle, während die andere sich zu einem Spermatogonium entwickelt. Dieses durchläuft vier mitotische Teilungen, wobei durch unvollständige Cytokinese und die Ummantelung durch zwei somatische Zysten Zysten aus jeweils 16 miteinander verbundenen Spermatogonien entstehen (Abbildung 3-12B). Interzelluläre Brücken dienen hierbei der Synchronisierung der Spermatogenese (Fuller 1998). Nach Abschluss der mitotischen Teilungen reifen die Keimzellen zu primären Spermatocyten heran, wobei sie eine Phase starken Wachstums und sehr hoher Genexpression durchlaufen. Der Großteil der transkribierten mRNA wird allerdings gespeichert und erst nach der Meiose translatiert. Nach der Meiose findet dagegen kaum noch weitere Transkription statt (Olivieri und Olivieri 1965; Brink 1968; White-Cooper et al. 1998; Lim et al. 2012). Postmeiotische Spermatiden sind am Beginn der Windung der Testes an ihrer speziellen Morphologie gut zu erkennen. Sie besitzen einen weißen Nukleus und ein gleichgroßes schwarzes Mitochondrien-Derivat, den sogenannten Nebenkern (Abbildung 3-12C; Abbildung 3-13). Es folgt die Elongationsphase, an deren Ende sich die Spermatiden über fast die gesamte Länge der Testes erstrecken (Abbildung 3-12A). Ein Aktin-basierender Individualisierungs-Komplex beginnt nun von der Spitze der aus 64 Spermatiden bestehenden Zyste die Spermatiden entlangzuwandern. Dabei wird durch apoptoseähnliche Prozesse cytoplasmatisches Material entfernt und in einer dabei wachsenden Struktur, dem „waste bag“ gesammelt (Tokuyasu et al. 1972; Fabrizio et al. 1998). Die nun einzelnen reifen Spermien sammeln sich daraufhin eng gewunden im Samenbläschen, das sich am basalen Ende der Testes befindet. Durch in-situ Hybridisierungen wurde die mRNA sowohl von Glob2 als auch von Glob3 hauptsächlich in

primären und meiotischen Spermatocyten, sowie postmeiotischen und frühen elongierenden Spermiden detektiert (Gleixner et al. 2012; Abbildung 1-4).

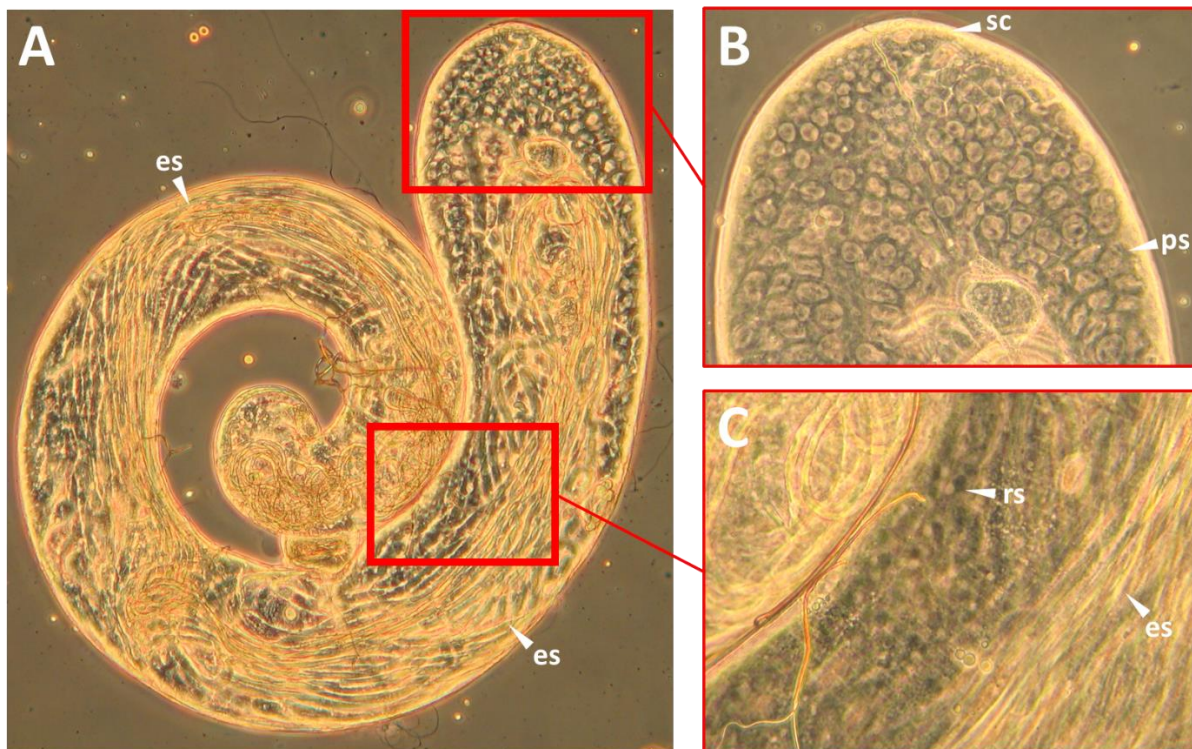


Abbildung 3-12. Phasenkontrastmikroskopie an Testes von *Drosophila melanogaster*. A: Gesamtansicht eines Testis. Die elongierten Spermien (es) sind als fadenartige Struktur entlang des Hodenschlauches erkennbar. B: Apikale Spitze mit Stammzellen (sc) und primären Spermatocyten (ps). C: Runde postmeiotische Spermiden (rs) am Beginn der Windung. Weitere Erläuterungen im Text.

Bei der Betrachtung der einzelnen Stadien in den hier untersuchten Fliegen konnten bei allen drei Stämmen mit Glob3-Knockdown bei einzelnen Präparaten Veränderungen in der Morphologie der postmeiotischen Spermiden beobachtet werden. Während die normal entwickelten Spermiden jeweils einen weißen Nukleus und einen etwa gleich großen schwarzen Nebenkern aufweisen (Abbildung 3-13A), zeigten sich bei einigen Präparaten der Stämme mit Transposon-Integration und RNAi-vermitteltem Knockdown Veränderungen in der Größe und der Anzahl von Nukleus und Nebenkern (Abbildung 3-13B-D). Diese Beobachtung spricht für einen durch die Reduktion von Glob3 bedingten fehlerhaften Ablauf der Meiose in diesen Fliegenstämmen.

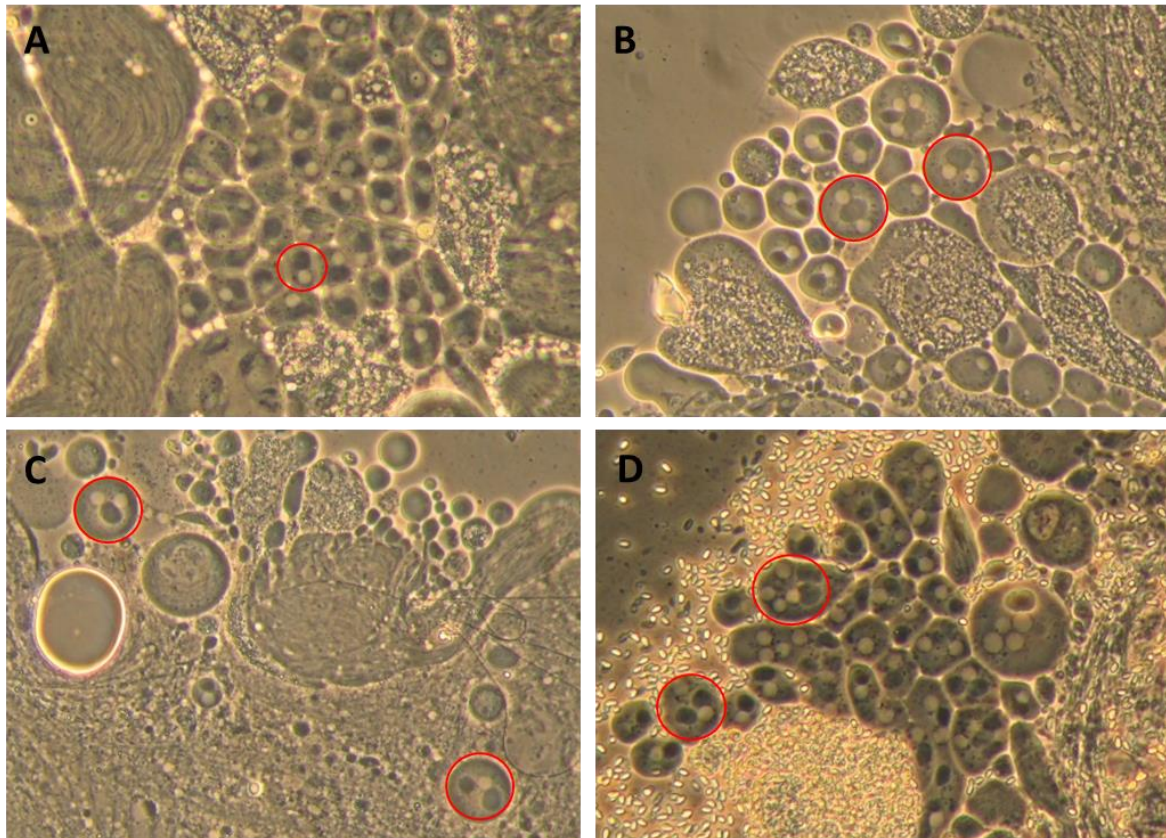


Abbildung 3-13. Phasenkontrast-Mikroskopie von postmeiotischen Spermatiden verschiedener *Glob3*-Knockdown Stämme. (A) Kontrolle *white*, (B) *Minos* homozygot, (C) *piggyBac* heterozygot, (D) *Glob3RNAi* x *daGal4*. Die wildtypischen Spermatiden weisen nach der Meiose einen einzelnen weißen Nukleus und einen etwa gleich großen schwarzen Nebenkern auf. Die Spermatiden der transgenen Fliegen zeigen dagegen Abnormitäten in Größe und Anzahl von Nukleus und Nebenkern, was auf Fehler bei der meiotischen Teilung hinweist.

3.2.3.3 Analyse der Spermatidenindividualisierung durch Immunfluoreszenzmikroskopie in Stämmen mit transkriptionellem Knockdown von *Glob3*

Um neben den gut unter Phasenkontrast zu beobachtenden Spermatogenesestadien auch den Ablauf der Spermatidenindividualisierung zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Während der Spermienindividualisierung wird das cytoplasmatische Material zwischen den Spermien einer Zyste entfernt und so die einzelnen reifen Spermien freigelegt. Dieser Vorgang beginnt an den kondensierten Zellkernen der Spermien, indem sich dort ein cytoskelettaler Membrankomplex bildet, der „*individualization complex*“ (IC), dessen größte Komponente Aktin darstellt. Der IC kann daher mit Phalloidin, das an Aktin bindet, detektiert werden, während die kondensierten Zellkerne mit dem an die DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI nachgewiesen werden können. Der IC wandert die Spermienzyste von den Zellkernen ausgehend entlang und entfernt dabei unter Einsatz der

Effektorcaspase drICE das cytoplasmatische Material. Dadurch entsteht um den IC eine Ausbuchtung, die „*cystic bulge*“ (CB), die durch einen an drICE bindenden Anti-Caspase3-Antikörper sichtbar gemacht werden kann (Arama et al. 2003). Am Ende der Individualisierung verbleibt neben den reifen Spermien ein „*waste bag*“ (WB), der das entfernte cytoplasmatische Material und die anderen Komponenten wie Aktin und drICE enthält (Fabrizio et al. 1998; Arama et al. 2003). Durch die Immunfluoreszenzfärbung konnten die verschiedenen Komponenten der Spermienindividualisierung erfolgreich sichtbar gemacht werden (Abbildung 3-14).

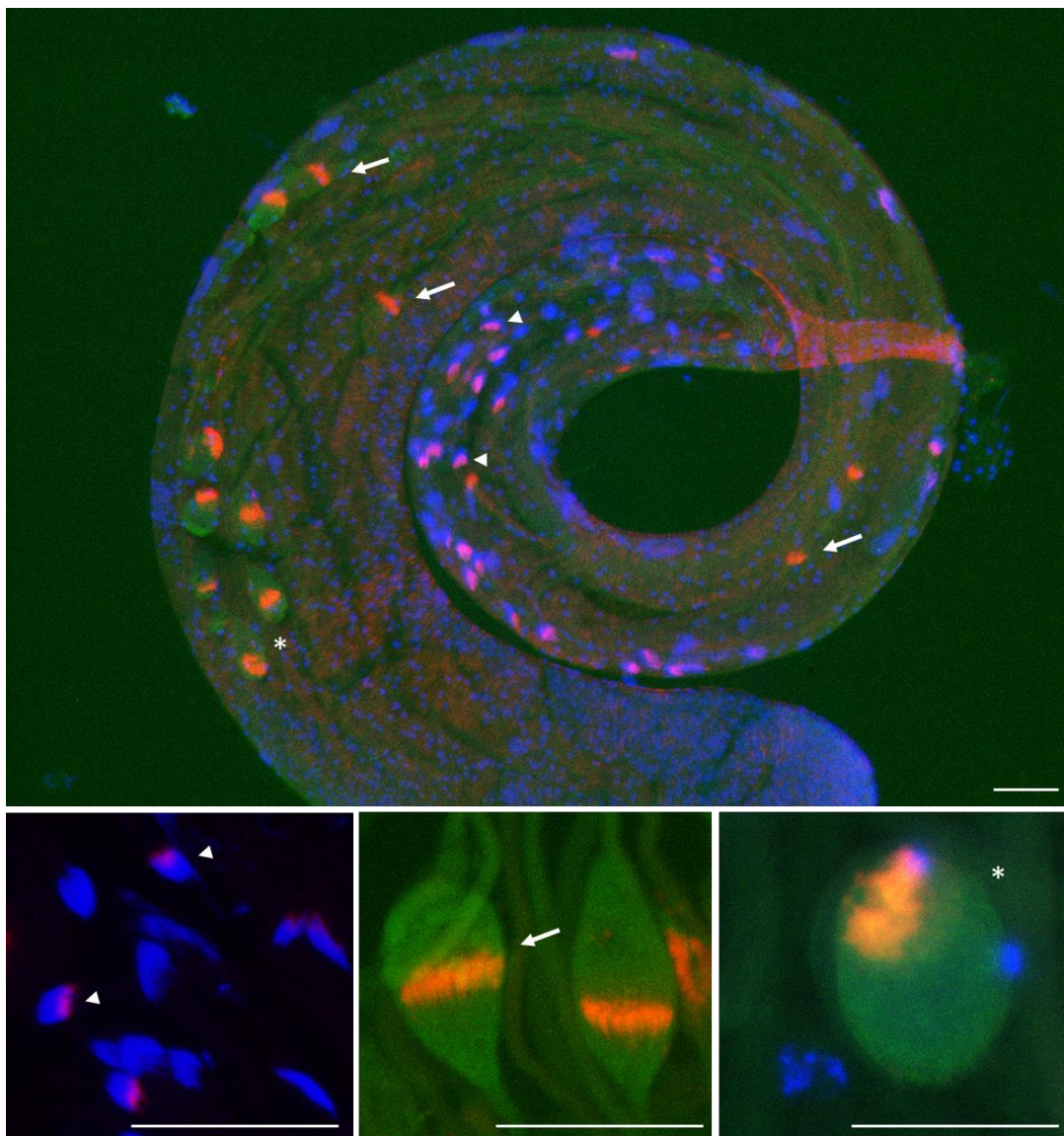


Abbildung 3-14. Immunfluoreszenzfärbung von Testes-Präparaten des Stammes *white*. Verschiedene Stadien der Spermienindividualisierung können entlang des Hodenschlauches beobachtet werden. Am basalen Ende sind die blauen Zellkerne, teilweise mit gekoppelten IC (pink) zu erkennen (Pfeilspitze). Der IC (orange) wandert von den Zellkernen in Richtung des apikalen Endes des Hodenschlauches und es bildet sich um den IC eine zunehmende grüne Ausbuchtung, der CB (Pfeil). Am apikalen Ende ist die Individualisierung abgeschlossen und die entstandenen WBs sind zu erkennen (Stern). Die Maßstabsbalken repräsentieren 50µm.

Die durch die DAPI-Färbung blauen Zellkerne liegen am basalen Ende des Hodenschlauches. Bei einigen Zellkernen hat der Individualisierungsprozess gerade begonnen und der IC wird direkt an den Zellkernen sichtbar. Die ICs sind mit TRIC-gekoppeltem Phalloidin gefärbt und erscheinen hier durch die Überlagerung mit den blauen Zellkernen pink. Andere ICs sind bereits weiter entlang der Spermien gewandert und sind an der orangenen Färbung zu erkennen. Bei fortgeschrittener Individualisierung sind um die ICs die mittels Caspase3-Antikörper und FITC grün gefärbten CBs zu erkennen. Schließlich sind apikal die entstandenen WBs zu sehen (Abbildung 3-14).

Um der Frage nachzugehen, ob der Knockdown von Glob3 einen Einfluss auf den korrekten Ablauf der Spermienindividualisierung hat, wurde die Immunfluoreszenz an Testes von jeweils mindestens zehn Männchen der drei Knockdown-Stämme durchgeführt. Hierbei konnten allerdings keine Hinweise auf eine fehlerhafte Individualisierung der Spermien gefunden werden (nicht gezeigt). Es ist allerdings möglich, dass sich die modulierte Glob3-Expression, ähnlich wie bei den Versuchen mit Überexpressionsfliegen, erst unter oxidativem Stress phänotypisch bemerkbar macht. Da die Fliegen mit erhöhter Expression eine höhere Toleranz gegenüber Hyperoxie aufwiesen (vgl. Kap. 3.2.2.3), könnte die verringerte Glob3-Expression zu einer größeren Anfälligkeit gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen führen. Daher wurden Testes aus Fliegen isoliert, die zuvor für 50 Stunden experimentell einer Sauerstoffkonzentration von 95% ausgesetzt waren. Eine folgende Immunfluoreszenzfärbung zeigte vereinzelt bei der verwendeten RNAi-Kontrollkreuzung (RNAi-UAS x white⁻) mit endogener Glob3-Expression faserige Zellkernstrukturen. Dies könnte auf eine durch den oxidativen Stress bedingte unvollständige Kondensation der Zellkerne zu Beginn der Spermienindividualisierung hindeuten (Abbildung 3-15B). In den allermeisten Testes-Präparaten der Kontrollen und auch in den Testes der Fliegen mit Glob3-Knockdown konnten allerdings keine Hinweise auf eine gestörte Spermienindividualisierung beobachtet werden (Abbildung 3-15A). Auf Ebene der Spermienindividualisierung konnte demnach durch die Immunfluoreszenzfärbung kein nachteiliger Effekt der verringerten Expression von Glob3 nachgewiesen werden.

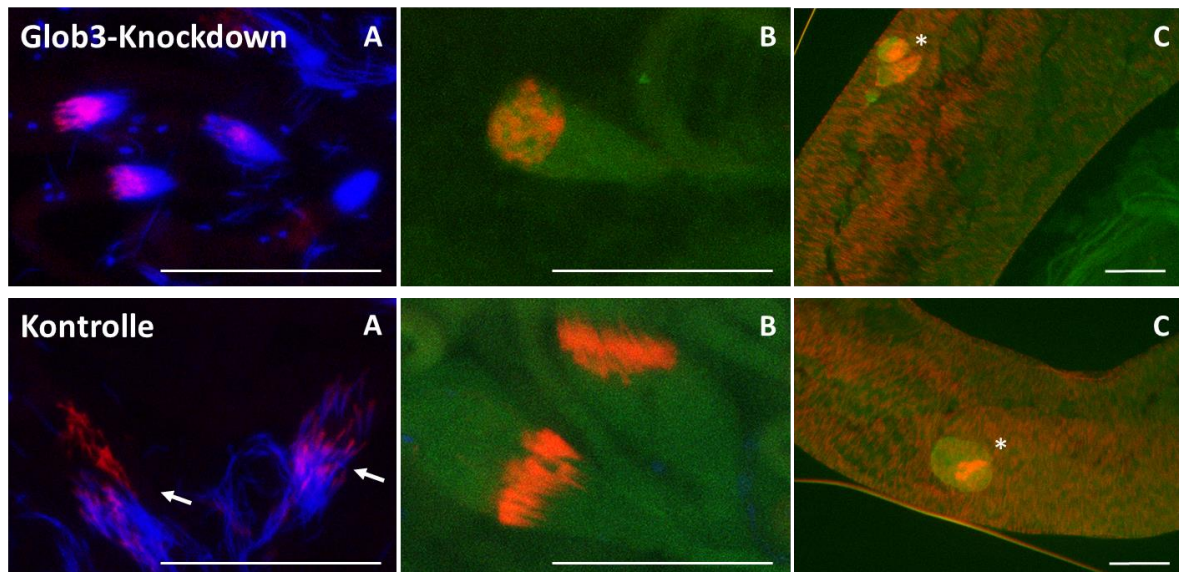


Abbildung 3-15. Immunfluoreszenzfärbung an Testespräparaten nach 50 Stunden Hyperoxie (95% O₂). Die Fliegen mit Glob3-Knockdown (Glob3-RNAi x daGal4) weisen nach oxidativem Stress eine normale Spermien-individualisierung auf. In den Testes der Kontrollkreuzung (Glob3RNAi x white⁺) zeigten sich vereinzelt unvollständig kondensierte Zellkerne (Pfeile). A: Zellkerne mit gekoppeltem IC; B: IC mit CB; C: WB (Stern) innerhalb des Hodenschlauchs. Die Maßstabsbalken repräsentieren 50µm.

3.2.3.4 Viabilität der Spermien in Fliegen mit transkriptionellem Knockdown von Glob3

Um weitere Effekte des Glob3-Knockdowns auf die Spermatogenese zu untersuchen, wurde die Spermienviabilität verschiedener Stämme (s. u.) verglichen. Hierzu wurde das LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Dieses Kit wurde ursprünglich für Mammalia-Spermien konzipiert, konnte aber auch schon an *Drosophila* erfolgreich angewendet werden (Snook und Hosken 2004; Holman 2009; Okada et al. 2011). Die Samenbläschen von adulten Männchen wurden präpariert und die reifen Spermien durch vorsichtiges Zerzupfen der Samenbläschen isoliert. Die Spermien wurden daraufhin mit den zwei an die DNA bindenden Farbstoffen SYBR14 und Propidiumiodid gefärbt. SYBR14 dringt dabei durch die Zellmembran und lässt so alle Spermienköpfe unter dem Fluoreszenzmikroskop grün erscheinen. Propidiumiodid kann dagegen nicht durch intakte Membranen dringen und färbt somit nur die Köpfe der toten Spermien rot. Durch Überlagerung beider Färbungen können tote und lebende Spermien identifiziert werden (Abbildung 3-16).

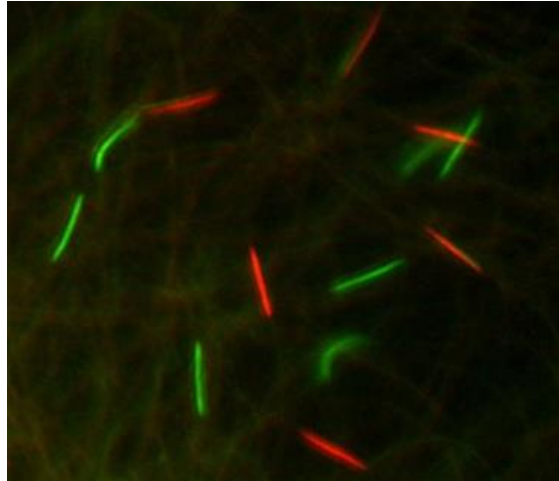


Abbildung 3-16. Gefärbte Spermien aus dem Samenbläschen eines Männchens des Stammes *white⁻* zur Ermittlung der Spermiviabilität. SYBR14 dringt durch die Zellmembran und färbt die Köpfe aller Spermien grün, Propidiumiodid färbt nur die toten Spermienköpfe rot.

Es wurden die Spermien von homo- und heterozygoten Fliegen für das Minos-Element, heterozygoten Fliegen für das piggyBac-Element und Fliegen mit RNAi-Knockdown verwendet. Als Kontrolle wurde für die Transposon-Stämme der Hintergrundstamm *white⁻* verwendet und für die RNAi-Kreuzung, analog zu den Versuchen mit Überexpressions-Kreuzungen, jeweils ein Elternstamm mit dem jeweiligen Hintergrund des anderen Elternstammes gekreuzt (hier in beiden Fällen *white⁻*). Von den für das Minos-Element heterozygoten Fliegen wurden acht Präparate und von den anderen Stämmen jeweils zwischen 15 und 20 Präparate untersucht. Von jedem Präparat wurden mehrere Bereiche fotografiert und anschließend die lebenden und toten Spermien ausgezählt. Für jedes Präparat wurde der Anteil der lebenden Spermien errechnet. Insgesamt wurden pro Stamm zwischen 4000 und 10000 Spermien ausgezählt (800 bei Minos heterozygot). Ein Teil der Präparate wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Anne Ackermann (2013) hergestellt und analysiert.

Zur statistischen Analyse wurden mit den prozentualen Werten zunächst eine Arkussinus-Wurzel-Transformation durchgeführt. Da einem F-Test zufolge die Varianzen der Stichproben inhomogen waren, wurde zum Vergleich der Spermiviabilitäten ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Es konnte hierbei eine signifikant geringere Viabilität der Spermien von Fliegen mit Glob3-Knockdown im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden (Abbildung 3-17). Dies zeigte sich sowohl bei den Stämmen mit Transposon-Integration als auch bei der RNAi-Kreuzung, wenngleich sich bei dieser nur zu einer der beiden Kontrollen ein signifikanter

Unterschied ergab (Abbildung 3-17 B). Dennoch weisen diese Ergebnisse auf eine wichtige Funktion von Glob3 für die korrekte Spermatogenese hin.

Innerhalb der Transposon-Stämme zeigte sich zudem eine geringere Spermienviabilität bei den für das Minos-Element homozygoten Männchen im Vergleich zu den beiden heterozygoten Stämmen, die aber nur zwischen Stämmen Minos homozygot und piggyBac heterozygot signifikant war (Abbildung 3-17 A). Der Unterschied zwischen den beiden Minos-Stämmen wurde durch den Mann-Whitney-U-Test dagegen nicht als signifikant bewertet, was womöglich durch die kleinere Stichprobengröße bei Minos heterozygot bedingt ist.

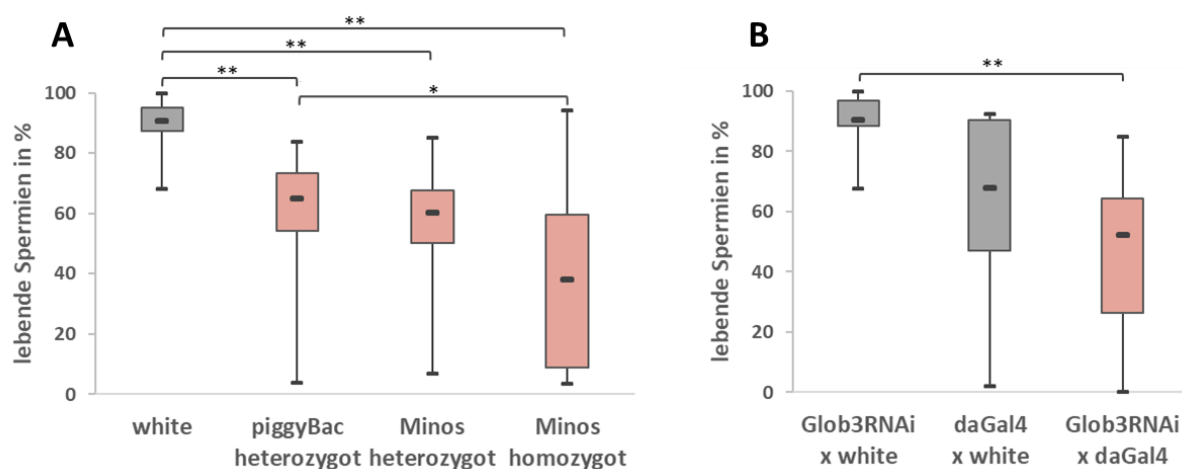


Abbildung 3-17. Anteil der lebenden Spermien in den Samenbläschen von Stämmen mit Glob3-Knockdown (rot) und Kontrollen mit endogener Glob3-Expression (grau). Die Stämme mit Knockdown von Glob3 weisen eine verringerte Spermienviabilität auf. Die Boxen umfassen die Werte des zweiten und dritten Quartils. Zusätzlich ist der Maximalwert, der Minimalwert und der Median angegeben. Signifikanz nach Mann-Whitney-U-Test: $*=p<0,05$; $**=p<0,01$

3.2.3.5 Fertilität der Männchen mit Glob3-Knockdown

Um zu überprüfen, ob eine verringerte Expression von Glob3 auch Einfluss auf die Fortpflanzungsfähigkeit hat, wurde die Fertilität der Männchen mit Glob3-Knockdown getestet. Dafür wurden je drei Männchen eines Stammes für fünf Tage täglich einzeln zu fünf Wildtyp-Weibchen gegeben. Die Weibchen wurden zur Eiablage fünf Tage in den Zuchtgefäßen gehalten und nach jeweils 15 Tagen die Nachkommen ausgezählt. Insgesamt schlüpften in dieser Zeit pro Männchen zwischen 113 und 419 Nachkommen. Diese absoluten Werte konnten allerdings nicht zum Vergleich der Fertilität herangezogen werden, da während der Ablage einige der Weibchen durch Verkleben im Futterbrei umkamen. Daher

wurde ein Fertilitätsindex errechnet, indem die lebenden Weibchen täglich gezählt und die Nachkommen aus jedem Zuchtgefäß auf die lebenden Weibchen pro Tag normalisiert wurden. Die Versuche wurden jeweils zweimal durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurden somit die Fertilitätsindizes aus 30 Zuchtröhrchen pro Stamm verwendet.

Zunächst wurde die Fertilität der Männchen verglichen, die heterozygot, bzw. homozygot für das Minos-Transposon waren. Auch wenn zwischen diesen Stämmen kein signifikanter Unterschied in der Glob3-Expression (Kap. 3.2.3.1), bzw. der Spermienviabilität (Kap. 3.2.3.4) beobachtet werden konnte, sollte überprüft werden, ob dennoch das homozygote Auftreten des Transposons in beiden Glob3-Allelen zu einer geringeren Fertilität gegenüber heterozygoten Fliegen führt. Tatsächlich wiesen die homozygoten Minos-Männchen eine entsprechende verringerte Fertilität auf (Abbildung 3-18A). Durch einen zweiseitigen T-Test wurde die Signifikanz dieses Unterschiedes bestätigt. Die folgende Untersuchung der Fertilität der Männchen mit RNAi-Knockdown ergab allerdings keinen Unterschied in der Fertilität zwischen den Knockdown- und Kontroll-Männchen, trotz des sehr starken Glob3-Knockdowns

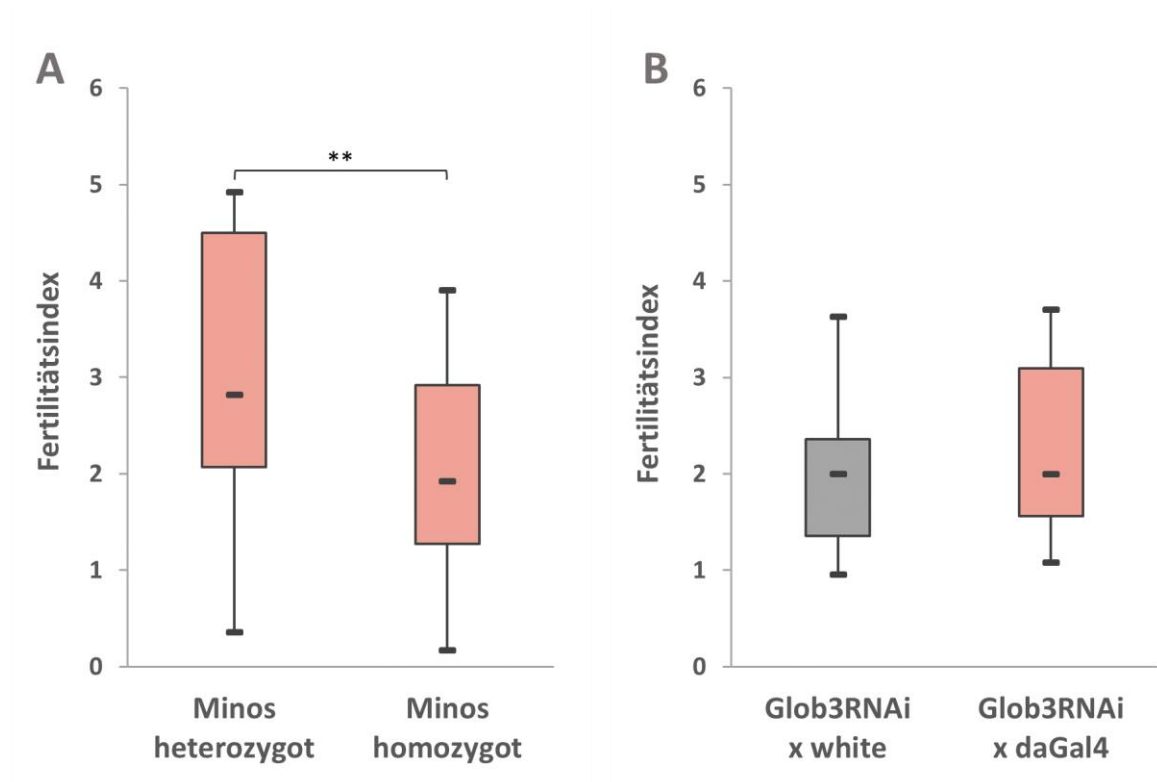


Abbildung 3-18. Vergleich der Fertilität der Männchen verschiedener Stämme. Für den Fertilitätsindex wurde die Anzahl der Nachkommen pro Weibchen und Tag berechnet. Eine verringerte Fertilität kann bei homozygoten Minos-Männchen im Vergleich zu heterozygoten Männchen beobachtet werden (A). Der RNAi-vermittelte Knockdown führt hingegen nicht zu einer geringeren Fertilität (B). Die Boxen umfassen die Werte des zweiten und dritten Quartils. Zusätzlich ist der Maximalwert, der Minimalwert und der Median angegeben. T-Test: ** = $p < 0,01$

und der deutlich geringeren Spermienviabilität der Männchen mit RNAi-Knockdown (Abbildung 3-18B). Inwieweit die gemessene geringere Fertilität der homozygoten gegenüber den heterozygoten Minos-Männchen tatsächlich auf eine Beeinträchtigung der Glob3-Expression zurückzuführen ist, muss daher offen bleiben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich eine verminderte Glob3-Expression nachteilig auf die Entwicklung und Viabilität der Spermien auswirkt. Der durch den Glob3-Knockdown beeinträchtigte Verlauf der Spermatogenese reicht allerdings offenbar nicht aus, um die Fertilität der Männchen deutlich zu beeinflussen.

3.2.4 Generierung von Fliegen mit genetischem Knockout von Glob1 mittels CRISPR/Cas9

Auch die Frage nach der Funktion des Glob1 von *Drosophila melanogaster* ist noch nicht abschließend geklärt (vgl. Kap. 1.3). Studien an Fliegen, bei denen mit unterschiedlichen Methoden die Glob1-Transkription reduziert wurde, kamen bei der Analyse der Funktion zu sich widersprechenden Ergebnissen (Yadav et al. 2015; Gleixner et al. 2016). Dies könnte durch die unterschiedliche, noch verbleibende Expression von Glob1 erklärt werden. Es sollte daher die CRISPR/Cas9-Technik verwendet werden, um Fliegen mit einem kompletten genetischen Knockout von Glob1 herzustellen.

Für das CRISPR/Cas9-Experiment wurden als Zielsequenzen der guideRNAs (gRNA) zwei Bereiche so gewählt, dass sie die beiden funktionell wichtigen Histidin-Kodons (HisE7 bzw. HisF8) im Exon2 des Glob1-Gens flankierten (Abbildung 3-19). Dadurch ergaben sich verschiedene Möglichkeiten für einen Knockout. Bereits das einfache Schneiden an der ersten Zielsequenz könnte zu einer Leserasterverschiebung und dadurch zu einem Knockout des für die Sauerstoffbindung entscheidenden Bereichs führen. Durch das Schneiden an beiden Zielsequenzen könnte gar der gesamte dazwischenliegende, etwa 140 Basen umfassende Bereich des Exon2 entfernt werden. Auf diese Weise konnten in *Drosophila* bereits Deletionen von 1,6 kb erzeugt werden (Kondo und Ueda 2013). Schließlich könnte es bei der gewählten Strategie zu Deletionen ohne Leserasterverschiebung im Bereich der Histidin-Kodons

kommen, was eine spezielle Analyse dieser funktionell wichtigen Aminosäurepositionen ermöglichen würde. Um zu vermeiden, dass ungewollte CRISPR-Ereignisse an anderen Stellen des Genoms entstehen („off-target-Effekte“), wurden gRNA-Zielsequenzen von 18 Basen Länge verwendet, da diese im Vergleich zu den häufig verwendeten 20 Basen langen Sequenzen die gleiche Effizienz, aber eine höhere Spezifität besitzen (Fu et al. 2014; Ren et al. 2014). Es konnte zudem mit Hilfe des Programmes GT-Scan (O'Brien und Bailey 2014) zu beiden Erkennungssequenzen keine anderen potentiellen Zielbereiche im Drosophila-Genom mit weniger als drei Basenunterschieden identifiziert werden.

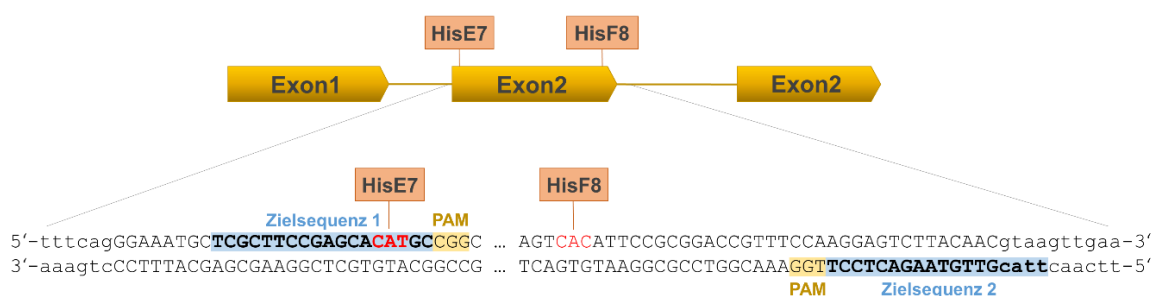


Abbildung 3-19. Positionen der gRNA-Zielsequenzen mit benötigter PAM-Sequenz und der funktionell wichtigen Histidine im Exon2 des Glob1-Gens. Die für die Histidine codierenden Triplets sind rot gefärbt.

Die gRNA-Zielsequenzen wurden in das Plasmid pCFD5 kloniert (Port und Bullock 2016; Abbildung 3-20). Dieses ermöglicht die gleichzeitige Expression mehrerer gRNAs durch den Promotor U6:3, der sich in vorherigen Experimenten als sehr effektiv erwiesen hat (Port et al. 2014). Die gRNAs sind dabei durch dazwischenliegende tRNA-Sequenzen miteinander verbunden und werden nach der Transkription durch die natürliche Prozessierung der tRNAs vereinzelt (Port und Bullock 2016).

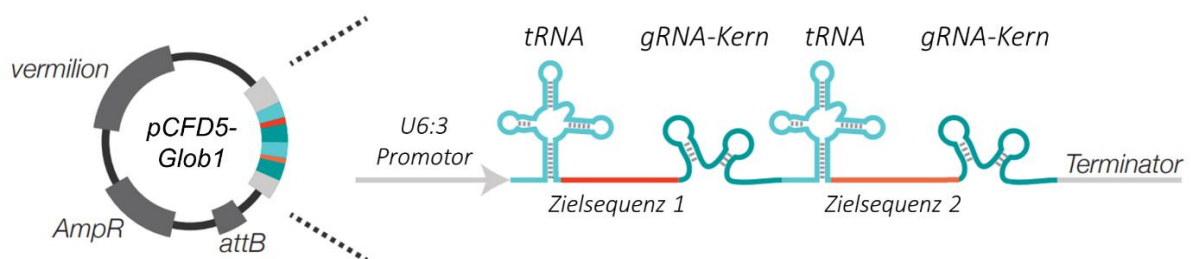


Abbildung 3-20. Aufbau des pCFD5-Plasmids mit integrierten Zielsequenzen. Das gesamte tRNA-gRNA-Konstrukt wird vom U6:3-Promotor aus exprimiert. Anschließend werden durch Prozessierung der tRNAs die gRNAs inklusive der spezifischen Zielsequenzen vereinzelt (verändert nach Port und Bullock 2016).

Das pCFD5-gRNA-Konstrukt konnte erfolgreich durch Mikroinjektion in die embryonale Keimbahn eingebracht werden, wo es an definierter Stelle in das Chromosom 2 integriert wurde. Die dadurch entstandenen transgenen männlichen Nachkommen wurden mit weiblichen Fliegen gekreuzt, die eine maternale Cas9-Expression aufwiesen. In der Keimbahn der Folgegeneration konnte es nun zu CRISPR-vermittelten Mutationen kommen und dadurch nach einer erneuten Kreuzung mutierte Nachkommen entstehen (vgl. Tabelle 2-6).

Aus insgesamt 77 einzelnen männlichen Nachkommen wurden Stämme etabliert und so das potentiell mutierte Glob1-Gen vervielfältigt. Durch eine PCR und anschließende Sequenzierung wurden die Stämme auf Mutationen überprüft (siehe Anhang). Keiner der 77 Stämme wies dabei eine Mutation im Bereich der zweiten Zielsequenz auf. An der ersten Erkennungssequenz kam es dagegen in zwei Fällen zu CRISPR-vermittelten Mutationsereignissen. Hierbei wies ein Stamm (Glob1KO) unmittelbar 5' aufwärts des distalen Histidins E7 eine Deletion von zehn Basen auf, die zu einer Verschiebung des Leserahmens und einem dadurch bedingten Translationsabbruch nach weiteren zwei Aminosäuren führte (Abbildung 3-21). Das eigentlich 153 Aminosäure lange Glob1 besteht daher in dieser Mutante nur aus den ersten 60 Aminosäuren, während der Rest des Proteins inklusive des funktionell essentiellen zweiten Exons fehlt. Diese Fliegen besitzen folglich kein funktionelles Glob1. Der zweite mutierte Stamm (Glob1DEL) weist an der gleichen Stelle eine Deletion von sechs Basen auf. Dies führt zu dem Verlust des distalen Histidins E7 und des folgenden Alanins, während der Rest des Globins erhalten bleibt, da es nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens kommt (Abbildung 3-21).

A		
Glob1WT	GGAAATGCT <u>TCGCTTCCGAGC</u> CAT GCCGGCAGAAATCATAAGGGTCTTTGAC	
Glob1DEL	GGAAATGCTCGCTTCCGAGC-----CGGCAGAAATCATAAGGGTCTTTGAC	-6
Glob1KO	GGAAATGCTCGCTTCCGAGC-----AGAAATCATAAGGGTCTTTGAC	-10
B		
Glob1WT	GNARFRA H AGRIIRVFDESIQVLGQDGDLEKLDEIWTKIAV SH IPRTVSKE SYN	
Glob1DEL	GNARFRA--GRIIRVFDESIQVLGQDGDLEKLDEIWTKIAV SH IPRTVSKE SYN	
Glob1KO	GNARFRAES*	

Abbildung 3-21. Deletionen innerhalb des Glob1-Gens in den Stämmen Glob1DEL und Glob1KO im Vergleich zu der wildtypischen Sequenz (Glob1WT). A) zeigt die Nukleotidsequenz und B) die resultierende Aminosäuresequenz des zweiten Exons. Die Zielsequenz für die Cas9-Endonuklease ist unterstrichen. Die funktionell wichtigen Histidine E7 und F8, sowie das für das distale Histidin E7 kodierende Triplett sind fett markiert.

Durch mehrere Kreuzungsschritte mit Balancer-Fliegen konnten anschließend Stämme generiert werden, die homozygot für die jeweiligen Deletionen sind. Es konnte dadurch gezeigt werden, dass die homozygoten Fliegen lebensfähig und fortpflanzungsfähig sind. Somit stehen Stämme mit vererbbarem Knockout von Glob1 bzw. einer Deletion des distalen Histidins E7 für weitere Analysen zur Verfügung. Zusätzlich wurden von den 77 sequenzierten Stämmen zwei weitere Stämme mit intaktem Glob1 auf die gleiche Weise homozygotisiert. Diese Stämme besitzen bis auf das Glob1 den identischen genetischen Hintergrund wie die Mutanten, inklusive des gleichen isogenisierten dritten Chromosoms. Sie eignen sich daher als ideale Kontrolle in den zukünftigen phänotypischen Untersuchungen. Es konnte mit diesen vier Stämmen somit ein optimales System zur funktionellen Analyse des Glob1 hergestellt werden.

4 Diskussion und Ausblick

Die Arthropoden sind die mit Abstand artenreichste Tiergruppe und haben die verschiedensten ökologischen Lebensräume besiedelt. Sie konnten sich dabei auch an Lebensräume mit sehr unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen adaptieren. Möglicherweise könnten hierbei auch Globine eine entscheidende Rolle gespielt haben. Obwohl Globine in allen Ordnungen der Lebewesen vorkommen und dabei funktionell sehr variabel sind, wurde deren weite Verbreitung in den Arthropoden aber lange Zeit aufgrund der effizienten O₂-Versorgung durch das Tracheensystem angezweifelt. Die in den letzten Jahren wachsende Anzahl bekannter Arthropoden-Globine legte allerdings bereits die Vermutung nahe, dass Globine in Arthropoden deutlich häufiger auftreten, als zuvor angenommen (Review: Burmester und Hankeln 2007). Dennoch fehlte es bislang an systematischer Kenntnis über die Verbreitung der Globine in den Arthropoden sowie über die Diversität und Evolution dieser Proteinfamilie.

4.1 Die Globine der Arthropoden: mindestens vier ancestrale Linien

Mit Hilfe der in öffentlichen Datenbanken verfügbaren genomischen und transkriptomischen Daten konnte in dieser Arbeit nun ein umfassender Überblick über das Auftreten von Globinen über den gesamten Stammbaum der Arthropoden gewonnen werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Globine tatsächlich zum Standard-Genrepertoire der Arthropoden gehören, da in allen Arten, deren komplette Genomsequenz verfügbar war, mindestens zwei unterschiedliche Globingene gefunden wurden (siehe Kap. 3.1., Fig.2).

Das Globinrepertoire der Arthropoden umfasst dabei mit den HbL, GbX und GbXL drei verschiedene Globin-Linien. HbL ist in allen Arthropoden präsent und auch GbXL ist ein phylogenetisch sehr verbreitetes Globin und in nahezu allen Arthropoden vorhanden. Die Brachyceren, inklusive des Modellorganismus *Drosophila melanogaster*, sind die einzigen Arthropoden, die kein GbXL-Gen besitzen. GbX findet sich dagegen nur in den basaleren Arthropoden und ist in den Holometabola verloren gegangen. Die phylogenetische Analyse zeigt, dass die HbL-, GbX- und GbXL-Sequenzen der Arthropoden jeweils monophyletische

Gruppen mit den entsprechenden Globinen der Deuterostomier bilden. Dies beweist die evolutionär frühe Entstehung dieser drei Globintypen, die bereits vor der Aufspaltung der Protostomier und Deuterostomier vor mindestens 900 Millionen Jahren (Hedges et al. 2004) stattgefunden haben muss. Die Deuterostomier besitzen außerdem mit Adgb und Ngb zwei weitere Globine, die nicht zum Globinrepertoire der Arthropoden gehören. Während Ngb in den Arthropoden gar nicht vorkommt, konnten Adgb-Gene zwar in einigen Hexapoden gefunden werden, allerdings scheint in all diesen Fällen die Globin-Domäne des chimären Proteins nicht funktionell zu sein. Außerhalb der Hexapoda und in den Dipteren wurden dagegen gar keine Adgb-Sequenzen identifiziert. Sowohl Adgb als auch Ngb sind allerdings ebenfalls evolutionär sehr anzestrale Proteine: Adgb konnte über den gesamten Metazoa-Stammbaum und sogar in Ceanoflagellata identifiziert werden und muss daher schon vor der Entwicklung der Metazoa entstanden sein (Hoogewijs et al. 2012). Auch Ngb ist nahezu im gesamten Tierreich verbreitet. Außer in Vertebraten konnten Ngb bereits in anderen Deuterostomiern, wie den Cephalochordata (Ebner et al. 2010) und den Echinodermata (Bailly und Vinogradov 2008; Hoffmann et al. 2012; Christensen et al. 2015) identifiziert werden, sowie auch außerhalb der Bilateria in den Placozoa (Dröge et al. 2012). Adgb und Ngb sind somit bereits deutlich vor der Aufspaltung der Protostomier und Deuterostomier entstanden. Der letzte gemeinsame Vorfahre der Bilateria muss somit bereits mindestens fünf verschiedenen Globine besessen haben: HbL, GbX, GbXL, Ngb und Adgb.

Die frühe Entstehung und weite Verbreitung von Ngb und Adgb spricht für sehr essentielle Funktionen dieser Proteine. Es ist daher erstaunlich, dass beide Globine offensichtlich von den Arthropoden nicht benötigt werden und vor der Aufspaltung der Arthropoden (Ngb), bzw. mehrmals innerhalb der Arthropoden (Adgb) verloren gegangen sind. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass deren Funktionen in den Arthropoden von anderen Globinen, möglicherweise von Vertretern der sehr heterogenen und flexiblen HbL übernommen wurden (siehe Kap. 4.2.2). Auffällig in diesem Zusammenhang ist das ähnliche Expressionsmuster von Glob2 und 3 der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dem Adgb der Mammalia, da alle drei Gene hauptsächlich in den Testes exprimiert werden (Gleixner et al. 2012; Hoogewijs et al. 2012). Es wäre daher denkbar, dass das in den Brachyceren vorkommende Glob2 (bzw. die Duplikate Glob2 und Glob3 in *Drosophila*) die Rolle des Adgb übernommen hat. Dies würde

allerdings noch nicht erklären, wie die übrigen Arthropoden den Verlust von Adgb kompensieren.

4.2 Acylierte Globine und ihre weite Verbreitung in Tieren

N-terminale Acylierungen von Proteinen, wie Myristoylierungen und Palmitoylierungen, ermöglichen eine Bindung der Proteine an Membranen (Resh 1999; Farazi et al. 2001; Linder und Deschenes 2007). Solche posttranslationalen Modifikationen können durch bestimmte typische Sequenzmotive bioinformatisch vorausgesagt werden. Für das GbX des Zebrafisches *Danio rerio*, das entsprechende Sequenzmotive für eine Myristoylierung und eine Palmitoylierung besitzt, konnte eine Membranbindung in Zellkulturversuchen auch experimentell nachgewiesen werden. Mutationen der N-terminalen Sequenz, die den Verlust der Acylierungsmotive zur Folge hatten, führten dagegen dazu, dass das Globin nicht mehr an die Zellmembran binden konnte (Blank et al. 2011). Eine physiologische Rolle des GbX des Zebrafisches (und anderer acylierter Globine) in der Sauerstoffversorgung ist aufgrund einer solchen Membranbindung eher unwahrscheinlich. Denkbar wären stattdessen eine membranassoziierte Signalfunktion des Globins oder eine Schutzfunktion vor membranschädigenden ROS (Blank et al. 2011; Koch und Burmester 2016; vgl. Kap. 4.2.3). Vermutlich acylierte Globine konnten durch bioinformatische Sequenzanalysen nicht nur in Deuterostomiern, sondern bereits auch in Protostomiern inklusive einiger Arthropoden identifiziert werden, sie sind somit weit über den Stammbaum der Metazoa verbreitet (Blank und Burmester 2012). Die in dieser Arbeit durchgeführte systematische Suche nach Acylierungsmotiven in den Arthropodenglobinen zeigte nun sogar, dass eine sehr große Zahl der Globine der Arthropoden aufgrund vorhandener Sequenzmotive potentiell myristoyliert und oft auch zusätzlich palmitoyliert sein kann.

4.2.1 GbX und GbXL: zwei verwandte, konservierte Globine mit potentieller Acylierung

Bis auf wenige Ausnahmen weisen alle GbX und GbXL der Arthropoden, wie zuvor auch bei anderen Bilateria gefunden (Blank und Burmester 2012), Acylierungsmotive auf. Das Auftreten von GbX und GbXL in den rezenten Protostomiern und Deuterostomiern zeigt, dass

bereits der letzte gemeinsame Vorfahre der Bilateria beide Globine besessen haben muss und diese vermutlich jeweils sowohl ein Myristoylierungs-, als auch ein Palmitoylierungssignal besaßen. Sowohl in den Protostomiern als auch in den Deuterostomiern kam es aber mehrfach zum Verlust von GbX oder GbXL (Abbildung 4-1).

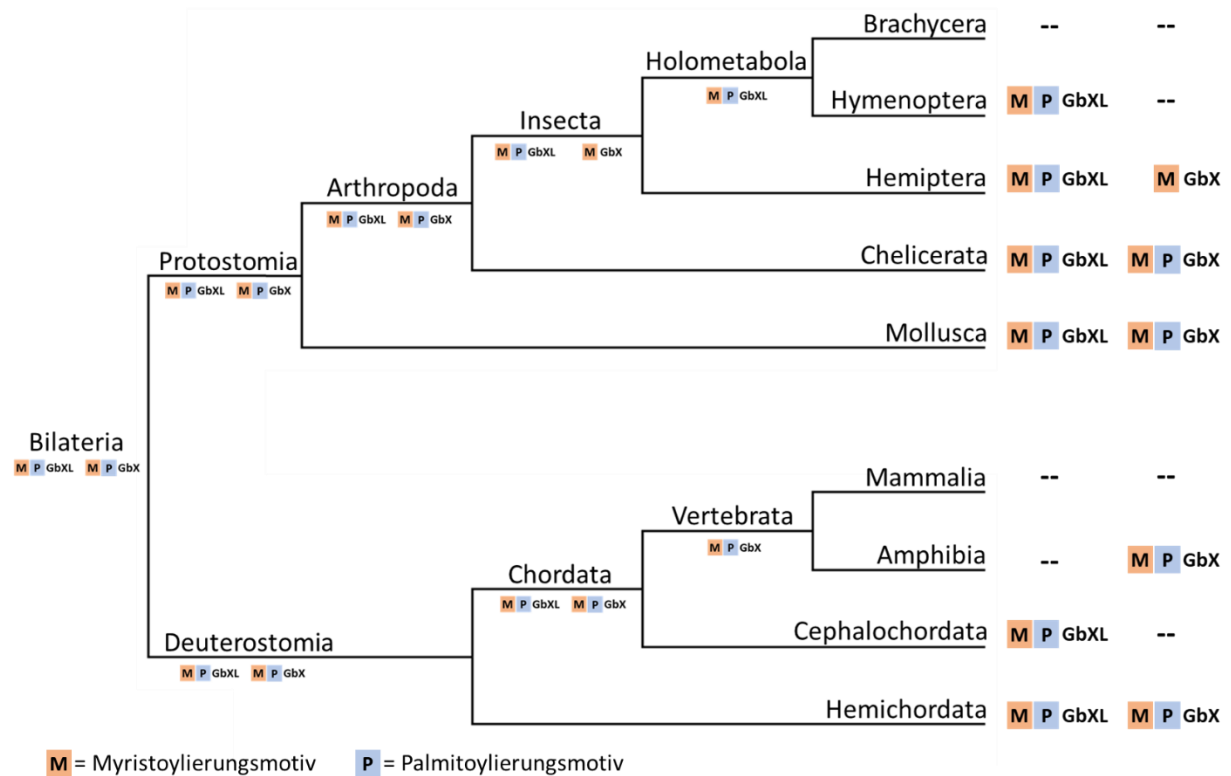


Abbildung 4-1. Auftreten von GbX und GbXL in beispielhaft ausgewählten Taxa der Bilateria.

In Protostomiern konnten außerhalb der Arthropoden in Muscheln Kopien von GbX und GbXL mit Palmitoylierungs- und Myristoylierungsmotiv identifiziert werden (Blank und Burmester 2012). Auch der Skorpion *Centruroides exilicauda*, als basaler Vertreter der Arthropoden besitzt Kopien von GbX und GbXL mit beiden Acylierungsmotiven. In allen anderen Arthropoden hat das GbX dagegen das Palmitoylierungssignal verloren, weist in den allermeisten Fällen aber weiterhin ein Myristoylierungssignal auf. Dies könnte zu einer schwächeren Membranbindung geführt haben, da durch eine zusätzliche Palmitoylierung die Bindung an die Membran stabilisiert wird (Resh 1999). Möglicherweise ging diese Abschwächung der Bindung auch mit einer funktionellen Änderung des GbX bei den

Arthropoden einher. Die höheren Insekten, die Holometabola, besitzen schließlich gar kein GbX mehr. Das GbXL ist dagegen in nahezu allen Arthropoden präsent und ist hier sowohl myristoyliert, als auch palmitoyliert. Es wäre daher denkbar, dass dieses zweifach acylierte Globin womöglich die ursprüngliche Funktion des GbX zusätzlich übernommen hat. Die Brachyceren sind schließlich die einzigen Arthropoden, die neben dem GbX auch das GbXL verloren haben. Sie sind die einzigen Vertreter dieser großen Tiergruppe, die kein acyliertes Globin besitzen.

Zu ähnlichen schrittweisen Verlustereignissen kam es auch während der Evolution von GbX und GbXL innerhalb der Deuterostomier (Abbildung 4-1). Während der Eichelwurm *Saccoglossus kowalevskii* als Vertreter der Hemichordaten noch beide Globine, GbX und GbXL, jeweils mit Myristoylierungs- und Palmitoylierungsmotiven aufweist, besitzt das Lanzettfischchen *Branchiostoma floridae* (Cephalochordata) nur noch das zweifach acylierte GbXL (Blank und Burmester 2012). In den Vertebraten ging dagegen zunächst das GbXL verloren (Blank und Burmester 2012; Hoffmann et al. 2012). Hier könnte entsprechend das zweifach acylierte GbX zusätzlich die Funktion des GbXL übernommen haben. Die Mammalia besitzen dagegen, analog zu den Brachyceren, weder GbX noch GbXL und auch kein anderes acyliertes Globin mit potentieller Membranbindung.

Die Vorfahren der Bilateria benötigten demnach noch beide membrangebundenen Schwesterglobine. Im Zuge der Evolution kam es aber mehrfach zum Verlust eines der beiden Globine, was funktionell möglicherweise durch das jeweils andere Globin kompensiert werden konnte. Die weite Verbreitung in den Bilateria und die starke Konservierung der Sequenzen, spricht für sehr essentielle Funktionen von GbX und GbXL. Es ist daher erstaunlich, dass mit den Brachyceren und den Vertebraten zwei sehr unterschiedliche Tiergruppen keine membrangebundenen Globine benötigen und es ist unklar, wie sie den Verlust dieser ansonsten in Tieren so konservativ evolvierenden Globin-Linien kompensieren.

4.2.2 Acylierungen auch bei HbL der Arthropoden

Acylierte Globine der HbL-Linie sind außerhalb der Arthropoden sehr untypisch und konnten bislang nur im Lanzettfischchen *Branchiostoma floridae* bioinformatisch vorhergesagt werden

(Blank und Burmester 2012). Innerhalb der Arthropoden weist dagegen eine Vielzahl der HbL N-terminale Myristoylierungsmotive auf. Zwar fehlt in diesen Fällen eine zusätzliche, stabilisierende Palmitoylierungssequenz, es konnte aber für das HbL der Strandkrabbe *Carcinus maenas* eine Membranbindung des Globins bereits experimentell nachgewiesen werden (Ertas et al. 2011). Die weite Verbreitung von myristoylierten HbL in den Arthropoden spricht dafür, dass auch das ursprüngliche Arthropoden-HbL myristoyliert war, wobei das Signal für die Myristoylierung (und damit möglicherweise die Membranbindung) aber mehrfach während der Evolution verlorengegangen ist (siehe Kap. 3.1., Fig.2 und Fig.5). Da in diesen Fällen, neben Globinen der GbX/XL-Linien offensichtlich kein weiteres Membran-gebundenes Globin benötigt wurde, konnten hier die HbL neue Funktionen übernehmen. Dies ging einher mit mehreren Gen-Duplikationsereignissen. Während GbX und GbXL in den meisten Fällen nur einmal im Genom vorkommen, treten die HbL bei vielen Arten in mehreren Kopien auf und bildeten so womöglich die Basis für die Evolution von Globinen mit neuen Funktionen. Die HbL könnten sich so zu einer sehr heterogenen Proteingruppe entwickelt haben, die sowohl ursprüngliche, membrangebundene intrazelluläre Globine (Ertas et al. 2011), aber letztlich auch extrazelluläre respiratorische Globine umfasst. Letztere finden sich etwa in Branchiopoden oder Dipteren (Weber und Vinogradov 2001). Andere HbL haben dagegen vermutlich sehr spezialisierte Funktionen entwickelt, wie zum Beispiel das HbL des Rückenschwimmers, das neben einer respiratorischen Funktion auch den Auftrieb der Wanze im Wasser reguliert (Matthews und Seymour 2006; Matthews und Seymour 2008; Wawrowski et al. 2012).

Das Auftreten von myristoylierten und palmitoylierten Globinen der Linien GbX, GbXL und HbL innerhalb der Arthropodenphylogenie untermauert die Theorie, dass alle Globine der Bilateria von einem ursprünglichen membrangebundenen Globin abstammen (Blank und Burmester 2012). Globine mit „klassischer“ respiratorischer Funktion hätten sich demnach mehrfach unabhängig voneinander entwickelt. Dies träfe nicht nur auf die verschiedenen respiratorischen HbL innerhalb der Arthropoden zu, sondern gälte auch für die in die Sauerstoffversorgung involvierten Myoglobin und Hämoglobin der Vertebraten (Storz et al. 2013; Burmester und Hankeln 2014; Schwarze et al. 2014).

4.2.3 Welche Funktionen haben GbX und GbXL?

Im Gegensatz zu den HbL-Globinen zeichnen sich die GbX und GbXL der Arthropoden durch eine auf mehreren Ebenen sichtbare starke Konservierung aus. Neben der Konservierung der Membranbindungsmotive und einer insgesamt hohen Sequenzidentität sind auf Genebene auch die Intronpositionen in GbX/XL erstaunlicherweise bis hin zu den Deuterostomiern stark konserviert. Dies und die basale Position dieser Varianten in der Globin-Phylogenie sprechen für eine sehr ursprüngliche Globinfunktion auch der rezenten GbX/GbXL-Proteine. Die im Gegensatz zu anderen Globinen starke Sequenzkonservierung könnte möglicherweise dafür sprechen, dass diese Proteine über die für die O₂-Bindung notwendige, typische Globinfaltung hinaus, bestimmte Aminosäure-Eigenschaften besitzen müssen. Während die für die Ausbildung der Globinfaltung notwendigen Aminosäureanordnungen relativ flexibel sind (Lesk und Chothia 1980), würde die darüber hinausgehende Konservierung auf Sequenzebene entweder zusätzliche enzymatische Funktionen der Globine erklären, oder aber die Globine treten mit anderen Proteinen in funktionell konservierte Interaktionen ein. Eine solche enzymatische Funktion bezüglich des NO-Metabolismus oder eine Signal-Funktion werden auch für die sehr ursprünglichen Globine der Bakterien diskutiert (Hou et al. 2001; Freitas et al. 2005; Vinogradov et al. 2005; Vinogradov et al. 2013a), während andere Globin-Funktionen, wie der Transport oder die Speicherung von Sauerstoff dagegen womöglich erst durch die Entwicklung vielzelliger Organismen und die Erhöhung des atmosphärischen Sauerstoffgehalts entstanden sind (Vinogradov und Moens 2008). Auch für GbX und GbXL ist nicht zuletzt aufgrund der Membranbindung eine entsprechende respiratorische Rolle in der Sauerstoffversorgung unwahrscheinlich. Gegen eine solche Funktion spricht auch, dass die GbX-Expression in adulten Zebrafischen unter Hypoxie abnimmt (Roesner et al. 2006). Stattdessen konnte gezeigt werden, dass GbX die Viabilität von Zellen unter oxidativem Stress erhöht und die Funktion von GbX somit womöglich im Schutz der Zellmembran vor ROS liegen könnte (Koch und Burmester 2016). Eine weitere Möglichkeit wäre eine membranassoziierte Signalfunktion (Blank et al. 2011). Eine für GbX und GbXL typische gleichzeitige Myristoylierung und Palmitoylierung kommt auch häufig bei G-Proteinen und anderen in die Signaltransduktion involvierten Proteinen vor (Nadolski und Linder 2007). Auch das ebenfalls sehr ursprüngliche und stark sequenzkonservierte Ngb scheint an verschiedenen

Signaltransduktionswegen beteiligt zu sein (Luyckx et al. 2018), ohne jedoch Hinweise auf eine Membranbindung zu geben.

Ähnliche Expression von GbX und GbXL in neuronalen Geweben

Weitere Hinweise auf die physiologische Funktion von GbX und GbXL liefert die Analyse der Expressionsmuster beider Globine (Abbildung 4-2). Im Krallenfrosch *Xenopus tropicalis* und dem Zebrafisch *Danio rerio* wurden neuronale Gewebe, wie das Gehirn und das Auge als Hauptexpressionsort von GbX ermittelt (Fuchs et al. 2006; Blank et al. 2011). Analysen in weiteren Fischen, sowie der Zierschildkröte *Chrysemys picta bellii* bestätigen die neuronale Expression von GbX bei Vertebraten, zeigen aber auch, dass weitere Hauptexpressionsorte der Darm und der Magen, also Gewebe des Verdauungstraktes sind (Götting und Nikinmaa 2015; Schwarze et al. 2015; Gallagher und Macqueen 2017). Naheliegender wäre, dass GbX hier eine Funktion im enterischen Nervensystem (ENS) hat, das aus einem komplexen neuronalen Netzwerk entlang des Verdauungstraktes besteht (Sasselli et al. 2012; Furness et al. 2014). Ausnahmen von dem genannten Expressionsmuster bilden der Goldfisch, bei dem GbX zwar im Darm, aber nicht mal eine schwache Expression in neuronalen Geweben, wie dem Gehirn oder dem Auge nachgewiesen werden konnte, und die Pflughnasenchimäre, bei der GbX am stärksten in der Milz, in Ovarien und in Testes exprimiert wird (Roesner et al. 2005; Opazo et al. 2015). Hier ist anzumerken, dass Ovarien und Testes in den meisten anderen Studien jedoch nicht berücksichtigt wurden und eine Expression von GbX in den Gonaden daher auch in den anderen untersuchten Spezies nicht ausgeschlossen werden kann. GbX und andere Globine konnten darüber hinaus unter anderem in den Erythrozyten von Fischen und des Krallenfrosches nachgewiesen werden. Die postulierte Expression von GbX in den Erythrozyten ist allerdings im Vergleich zu der im Gehirn sehr gering (Götting und Nikinmaa 2015; Corti et al. 2016).

Die in dieser Arbeit ermittelte Expression von GbXL in den Gehirnen der Zuckmücke und der Biene entspricht der neuronalen Expression des GbX der Vertebraten, allerdings konnte im Darm der Zuckmücke und im Abdomen der Biene nur eine sehr geringe, bzw. gar keine Expression von GbXL gemessen werden. Auch in den Gonaden der Biene findet keine nennenswerte Expression statt. Das Ergebnis spricht daher für eine ursprüngliche Expression

von GbX und GbXL in neuronalen Geweben wie dem Gehirn. Ob der Verdauungstrakt ebenfalls ein ursprünglicher Expressionsort von GbX/XL oder spezifisch für das GbX der Vertebraten oder Deuterostomier ist, lässt sich anhand der vorhandenen Daten nicht beurteilen. Um diese Frage zu klären, sind weitere gewebspezifische Expressionsanalysen notwendig. Da aber auch der Verdauungstrakt von einem dichten Nervensystem umgeben ist, ist in jedem Falle eine neuronale Funktion von GbX/XL naheliegend. Diese könnte etwa in der Beteiligung an neuronalen Signalwegen liegen. Da ähnliches auch für das ebenfalls ancestrale Ngb berichtet wurde (Luyckx et al. 2018), könnte dies auch ein Hinweis auf eine entsprechende Funktion der ursprünglichen Metazoa-Globine sein.

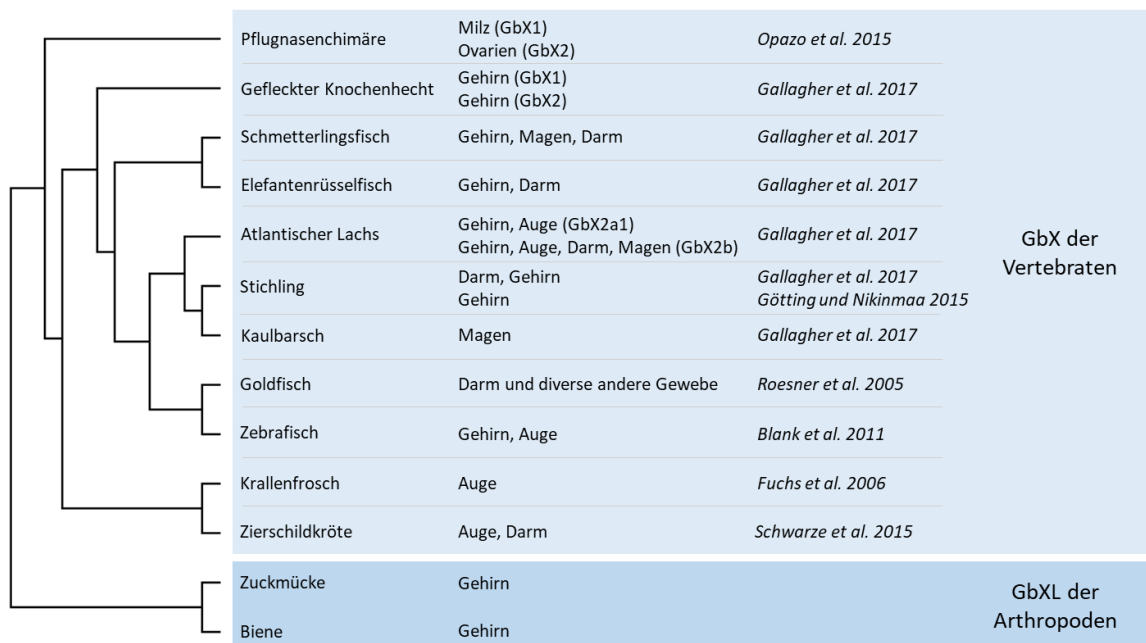


Abbildung 4-2. Übersicht über die in der Literatur angegebenen Hauptexpressionsorte von GbX in Vertebraten im Vergleich zum GbXL der Arthropoden.

Globine in der Redox-vermittelten Signalfunktion

Während ROS in der Vergangenheit hauptsächlich als schädliche Moleküle angesehen wurden, wuchs in den letzten Jahren die Erkenntnis, dass die gezielte Produktion von ROS eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion spielen (Dickinson und Chang 2011; Finkel 2011). Zwei Hauptquellen sind für die Bildung von ROS verantwortlich. Neben der Entstehung als Nebenprodukt der mitochondrialen Elektronentransportkette werden sie von

membrangebundenen NADPH-Oxidasen (Nox) gebildet (Brandes et al. 2014). Nox sind meist auch bei der ROS-vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Durch sie wird O₂ an der Zellmembran gezielt zu hochreaktivem Superoxid reduziert, welches wiederum durch eine Superoxid-Dismutase (SOD) zu H₂O₂ umgesetzt wird. Dieses fungiert als Botenstoff und kann unter anderem die Konformation von Zielproteinen beeinflussen, indem bestimmte Aminosäurereste oxidiert werden (Dickinson und Chang 2011). Häufig betroffen sind dabei Cysteine (Netto et al. 2007). Die Bindung der Nox an die Membran sorgt dabei für eine räumliche Nähe zu den weiteren Komponenten des Signalweges, was den gezielten Ablauf der Reaktionen ermöglicht und verhindert, dass die gebildeten ROS ungewollt mit anderen Molekülen reagieren (Dickinson und Chang 2011). In der Beteiligung an solchen Redox-vermittelten Signalwegen könnte auch die ursprüngliche Funktion der Globine liegen. In der Tat konnte in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* eine entsprechende Funktion des Globins GLB-12 nachgewiesen werden (De Henau et al. 2015; De Henau und Braeckman 2016). Das infolge N-terminaler Acylierungen membrangebundene GLB-12 übernimmt hierbei die oben beschriebene Rolle der Nox und produziert Superoxid. Neben GLB-12 wurden mit GLB-6 und GLB-26 noch zwei weitere, ebenfalls membrangebundene Globine von *C. elegans* mit einer Signalfunktion in Verbindung gebracht (Yoon et al. 2010; Tilleman et al. 2011). *C. elegans* besitzt insgesamt 33 verschiedene Globine, die hauptsächlich in neuronalen Geweben exprimiert werden (Hoogewijs et al. 2008). GLB-12, dessen Funktion wichtig für die Fortpflanzung der Fadenwürmer ist, wird zusätzlich in somatischen Zellen der Gonaden exprimiert (De Henau et al. 2015). Die Globine von *C. elegans* weisen eine hohe Sequenzdiversität zu anderen andere Metazoa-Globinen auf und konnten daher in einer phylogenetischen Untersuchung keiner der Hauptgruppen der Globine zugeordnet werden (Blank und Burmester 2012). Ob es sich bei GLB-6, 12 und 26 womöglich um Globine der GbX/XL-Gruppe handelt, ist daher unklar. Dennoch ist die Analogie zu den GbX/GbXL der Arthropoden und anderer Tiere sehr suggestiv.

Globine mit Signalfunktion könnten auch innerhalb des neuronalen Endocannabinoid-Systems (ECS) eine Rolle spielen. Forschungen der letzten Jahre belegen einen engen Zusammenhang zwischen dem ECS und der ROS-Homöostase (Lipina und Hundal 2016). Eine Beteiligung von Globinen ist daher gut vorstellbar. Interessanterweise wurde im Gehirn von Mäusen und Ratten Hemopressin nachgewiesen, ein neun Aminosäure langes Peptid des α -Hämoglobins

(Dale et al. 2005; Heimann et al. 2007). Dieses Peptid bindet an den Cannabinoid-Rezeptor CB1 und wirkt dort als Antagonist, während N-terminal verlängerte Formen des Hemopressin als Agonisten des CB1-Rezeptors auftreten (Heimann et al. 2007; Gomes et al. 2009). Womöglich könnte dies ein Hinweis auf eine Beteiligung von Globinen am Endocannabinoidsystem sein.

Wieso benötigen die Brachyceren kein Membran-Globin?

Die offensichtlich essentielle Funktion von membrangebundenen Globinen wirft die Frage auf, warum die Brachyceren als einzige Arthropoden ohne acyliertes Globin auskommen. Ein potentieller Ersatz könnte das Glob2 der Brachyceren (bzw. die Duplikate Glob2 und Glob3 von *Drosophila*) sein, da das Auftreten dieses Globins in den Brachyceren zeitlich mit dem Verlust des GbXL korreliert. Die Sequenz des Glob2 weist eine im Vergleich zum Glob1 hohe Evolutionsrate auf (Burmester et al. 2006; Gleixner et al. 2012), was für eine neu gewonnene Funktion dieses Globins spricht. Das fehlende Membranbindungsmotiv bei Glob2 und die exklusive Expression in den Testes sprechen aber gegen eine einfache Übernahme der GbXL-Funktion durch Glob2. Wahrscheinlicher ist daher, dass das Glob2 eine von GbXL unabhängige Funktion besitzt und die Brachyceren den Verlust von GbXL auf anderem Wege kompensieren. Ein interessanter Ansatz zur Klärung dieser Frage wäre es, die verschiedenen Komponenten bekannter Signaltransduktionswege bioinformatisch hinsichtlich ihrer Sequenz und Expression zu untersuchen. Unterschiede zwischen den Brachyceren und anderer Dipteren könnten Hinweise auf einen veränderten Ablauf der Signaltransduktion und eine mögliche Beteiligung des GbXL liefern. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass in den Insekten, anders als in anderen Arthropoden, kein Hinweis auf Cannabinoidrezeptoren gefunden werden konnte, das Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol (2-AG) aber weiterhin synthetisiert wird (McPartland et al. 2001; McPartland et al. 2006). Auch wenn dies nicht den Unterschied im Globin-Repertoire zwischen den Brachyceren und anderen Insekten erklärt, ist es dennoch ein Zeichen für die evolutionäre Dynamik von Signaltransduktionswegen.

4.3 Glob2 und Glob3 bei *Drosophila melanogaster*: Genduplikate mit divergierenden Funktionen in der Spermatogenese

Die Genduplikate Glob2 und 3 von *Drosophila melanogaster* (bzw. das entsprechende Einzelkopie-Glob2 der anderen Brachyceren) unterscheiden sich in mehrerer Hinsicht von den anderen HbL der Arthropoden. Zum einen wird dies bereits auf Sequenzebene deutlich. Die im Vergleich zum Glob1 hohe Sequenzevolutionsrate führt zu einer abweichenden Positionierung der Glob2/3-Klade innerhalb des phylogenetischen Baumes der HbL-Gene. Im Vergleich zu anderen HbL sind Glob2 und 3 außerdem verhältnismäßig große Proteine, was durch N- und C-terminale Extensionen bedingt ist. Anders als bei den ebenfalls verlängerten GbX und GbXL beinhaltet das N-terminale Ende hier allerdings keine Acylierungsmotive. Glob2 und Glob3 von *Drosophila melanogaster* weisen außerdem ein sehr spezialisiertes Expressionsmuster auf, das auf die Testes der männlichen Fliegen beschränkt ist. Die Evolutionsrate und das Expressionsmuster sprechen für eine neu gewonnene Funktion dieser Globine, die vermutlich in der Spermatogenese eine spezifische Rolle spielen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse von Fliegen mit transkriptionellem Knockdown von Glob3 erstmals bestätigt werden, da hier fehlentwickelte postmeiotische Spermatiden sowie eine herabgesetzte Spermienviabilität beobachtet werden konnte. Worin die genauen physiologischen Funktionen von Glob2 und Glob3 bestehen, ist bislang dennoch unklar.

Um einer funktionellen Charakterisierung von Glob2 und 3 näher zu kommen, wurde in dieser Arbeit deren Lokalisation innerhalb der Zellen bestimmt. Hierfür wurde eine subzelluläre Fraktionierung der Proteine aus abdominalem Gewebe von *Drosophila*-Männchen durchgeführt. Wie durch das Fehlen von Acylierungsmotiven innerhalb der Proteinsequenz bereits zu erwarten war, konnte dabei keine Anreicherung von Glob2 in der Membranfraktion beobachtet werden. Glob2 befindet sich stattdessen hauptsächlich im Cytosol. Die Anwesenheit von Glob2 im Cytosol wurde durch eine weitere Studie bestätigt, in der Globin-GFP-Fusionskonstrukte in S2-Zellen transferiert wurden, die keine endogenen Globine exprimieren (Burmester et al. 2017). Neben einem Signal im Zellkern, das als Artefakt des GFP-Konstrukts interpretiert wird, zeigte sich ein gleichmäßig verteiltes GFP-Signal im Cytoplasma der Zelle (Abbildung 4-3). In einem Parallelversuch wies das Glob3-GFP-Konstrukt dagegen eine abweichende, aber ebenfalls nicht mit der Membran assoziierte Lokalisation auf. Hier zeigte sich eine punktförmige Verteilung des Globins innerhalb des Cytoplasmas (Abbildung 4-3).

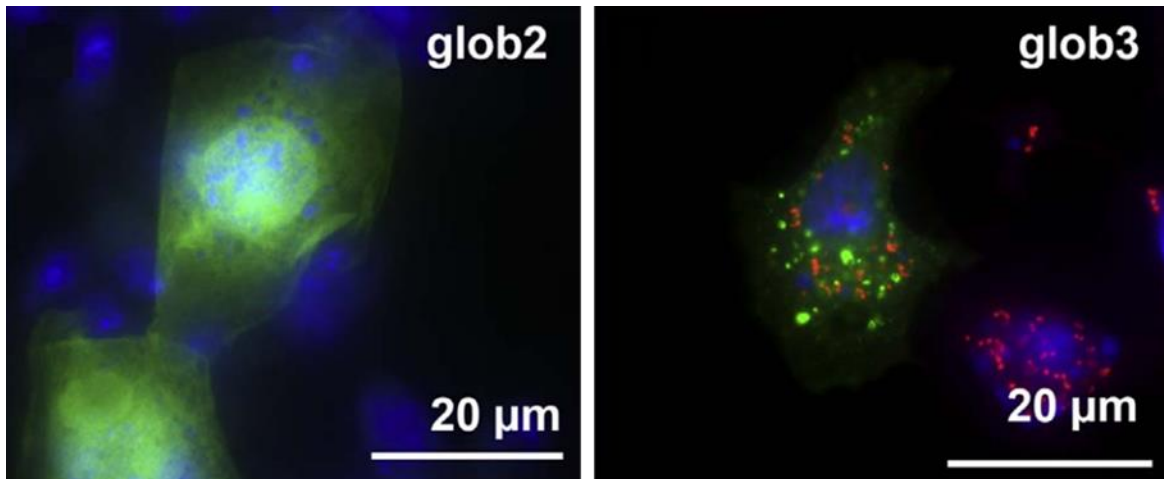


Abbildung 4-3. Unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation von Globin-GFP-Konstrukten in S2-Zellen. GFP-Fluoreszenz ist grün, die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Bei Globin3 sind die Zellen zusätzlich mit dem Golgi-Marker GM130 rot gefärbt, um eine mögliche Kolokalisation mit der punktförmigen Verteilung der Glob3-Konstrukte zu untersuchen (Burmester et al. 2017).

Worum es sich bei diesen Strukturen handelt blieb unklar. Eine gleichzeitige Färbung des Golgi-Apparates ergab keine Kolokalisierung. Auch eine Lokalisation in den Mitochondrien wurde anhand der Verteilung ausgeschlossen (Burmester et al. 2017). Die beobachteten Unterschiede zwischen Glob2 und Glob3 wiesen allerdings darauf hin, dass beide Globine voneinander unabhängige Funktionen entwickelt haben. Worin die jeweilige Rolle von Glob2 und Glob3 dabei genau besteht, ist allerdings nicht abschließend geklärt. Verschiedene mögliche Funktionen können dabei diskutiert werden:

- *Redox-Signalfunktion*

Aufgrund der Expression von Glob2 und 3 in den Testes von *Drosophila* könnten diese Globine eine ähnliche Signalfunktion wie das für die Reproduktion wichtige GLB12 in *C. elegans* haben. De Henau und Kollegen (2015) konnten zeigen, dass das von GLB12 ausgelöste Redox-Signal einen anti-apoptotischen Effekt hat. GLB12 scheint also an der Regulation apoptotischer Prozesse innerhalb der Keimbahn beteiligt zu sein. Auch während der Spermienindividualisierung in den Testes von *Drosophila* kommt es zu Apoptose-ähnlichen Prozessen unter Beteiligung von Caspasen und einer spezifischen Isoform des Cytochrom-C (Arama et al. 2003; Huh et al. 2004; Muro et al. 2006; Arama et al. 2007). Denkbar wäre es, dass das Cytochrom-C durch Glob2 oder Glob3 reduziert wird, wodurch eine nachfolgende Caspase-Aktivierung ausbleibt und die Apoptose dadurch inhibiert wird. Eine entsprechende Funktion wurde auch bereits für Ngb in neuronalen Zellen diskutiert (Fago et al. 2008;

Raychaudhuri et al. 2010). Ein Knockdown des Globins sollte dann zu einer erhöhten Apoptoseaktivität führen, wodurch der korrekte Ablauf der Spermienindividualisierung gestört würde. Allerdings konnten durch die durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen keine Anzeichen einer gestörten Spermienindividualisierung bei Fliegen mit Glob3-Knockdown gefunden werden. Dennoch ist eine Signalfunktion an anderer Stelle der Spermatogenese möglich. Glob3 könnte etwa eine entsprechende Funktion während der Meiose besitzen, was die beobachteten Defekte bei postmeiotischen Zellen nach Glob3-Knockdown erklären würde. Ähnliche Aberrationen der postmeiotischen Spermatiden konnten bei Fliegen mit mutiertem *abnormal spindle*-Gen (*asp*) beobachtet werden (Casal et al. 1990). Bei *asp* handelt es sich um eine Komponente des Spindelapparates. In *asp*-Mutanten kommt es daher während der Meiose zu Fehlern bei der Chromosomensegregation (Ripoll et al. 1985). Auch für Glob3 wäre daher eine Rolle während der Meiose plausibel.

- *ROS-Schutz*

Trotz der Nützlichkeit von ROS innerhalb von Redox-Signalwegen sind die Testes sehr anfällig für durch ROS vermittelte Schäden, weshalb antioxidativen Mechanismen eine wichtige Rolle in der Spermatogenese zukommt (Aitken und Roman 2008; Guerriero et al. 2014). Auch Glob2 und Glob3 könnten daher eine entsprechende Funktion im Schutz vor oxidativen Schäden haben. Für eine solche Funktion sprechen vor allem die durchgeführten Experimente mit transgenen Fliegen, die eine exogene ubiquitäre Expression von Glob2 und 3 aufweisen, da diese Fliegen eine höhere Toleranz gegenüber Hyperoxie aufwiesen. Dies konnte in vitro durch Zellkulturversuche bestätigt werden, bei denen Globine in S2-Zellen exprimiert wurden (Burmester et al. 2017). Auch hier wiesen Glob2 exprimierenden Zellen eine erhöhte Toleranz gegenüber ROS-vermitteltem Stress auf. Die Expression von Glob3 bewirkte hier allerdings keinen Effekt. Passend zur Hypothese einer Schutzfunktion vor ROS konnte mit quantitativer RT-PCR eine herunterregulierte Expression von Glob2, aber auch von Glob3 unter hypoxischen Bedingungen gemessen werden, eine reziproke Erhöhung der Expression unter Hyperoxie blieb allerdings dagegen aus (Gleixner et al. 2012). Für Glob2 konnte aber in einer anderen Studie durch eine Microarray-Analyse unter Hyperoxie eine entsprechende, wenn auch geringe Erhöhung der Expression um 20% ermittelt werden (Landis et al. 2004). Zumindest für Glob2 scheint eine Funktion in der Abwehr vor schädlichen ROS aufgrund dieser Daten sehr plausibel.

- *Sauerstoffversorgung*

Denkbar wäre auch eine spezielle Sauerstoffversorgungsfunktion von Glob2 und 3 innerhalb der Testes. Das beschriebene Expressionsmuster unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen spricht allerdings zunächst gegen eine O₂-Transportfunktion (Gleixner et al. 2012). Möglich wäre aber eine Rolle als Sauerstoffspeicher, wie sie auch für Glob1 diskutiert wird (Gleixner et al. 2016). Die Expression der Globine würde hier der Menge an zu speicherndem Sauerstoff angepasst, wodurch es zu einer geringeren Expression unter Sauerstoffmangel kommen würde. Eine solche Funktion kann allerdings nicht die höhere Viabilität der Überexpressions-Fliegen unter Hyperoxie erklären und erscheint daher eher unwahrscheinlich.

Ausblick: ein genetischer Knockout von Glob2 und Glob3 in Drosophila

Die Fliegen mit reduzierter transkriptioneller Expression von Glob3 zeigten zwar Beeinträchtigungen im Ablauf der Spermienentwicklung, die die erwartete Funktion des Globins innerhalb der Spermatogenese bestätigen. Ein stärkerer Effekt, bis hin zur Infertilität der Fliegen, blieb aber trotz der um bis zu 98% reduzierten Menge an Glob3-mRNA aus. Hierfür verantwortlich könnte neben der noch vorhandenen Restexpression auch das Glob2 sein, das womöglich die Rolle des fehlenden Glob3 übernehmen kann. Analysen der Sequenzevolution und der zellulären Lokalisation von Glob2 und Glob3 (s.o.) weisen zwar auf unterschiedliche Funktionen beider Globine hin (Gleixner et al. 2012; Burmester et al. 2017), dennoch ist ein solch kompensatorischer Effekt durch Glob2 nicht vollends auszuschließen. Zur weiteren Analyse der Funktion von Glob2 und Glob3 wäre es daher sinnvoll, mittels CRISPR/Cas9 Fliegen mit komplettem genomischen Knockout von jeweils einem der beiden Gene und zusätzlich auch Fliegen mit gleichzeitigem Knockout beider Globin-Duplikate zu generieren. Dazu könnte das gleiche System wie beim durchgeführten Knockout von Glob1 verwendet werden (vgl. Kap. 3.2.4), da der verwendete Vektor pCFD5 die gleichzeitige Expression mehrerer gRNAs ermöglicht (Port und Bullock 2016). Auch wenn es beim CRISPR-Experiment zum Knockout von Glob1 nur zu seltenen Mutationsereignissen kam (vgl. Kap. 4.4.1), sollten auf diese Weise bei einer ausreichenden Anzahl an genotypisierten Nachkommen sowohl Fliegen mit individuellem Knockout von Glob2 oder Glob3, als auch Fliegen mit einem gleichzeitigem Knockout beider Globine generiert werden können. Mit diesen transgenen Fliegen und geeigneten

Kontrollstämmen sollten die hier durchgeführten Experimente zur Phänotypisierung wiederholt werden. Um zusätzlich der Frage nachzugehen, ob insbesondere Glob2 eine Schutzfunktion vor ROS hat, wäre es sinnvoll, die Knockout-Fliegen auf die Menge von anwesenden ROS zu untersuchen. Hierfür könnten die Testes mit dem ROS-Indikator Dihydroethidium (DHE) gefärbt werden (vgl. Owusu-Ansah und Banerjee 2009). Außerdem sollte das Ausmaß der durch ROS verursachten Schäden sowohl an der Zellmembran, als auch an der DNA durch Messung der Lipid-Peroxidation, bzw. durch TUNEL-Färbung (Gavrieli et al. 1992) in Knockout- und Wildtyp-Stämmen vergleichend ermittelt werden. Neben diesen phänotypischen Experimenten könnten die Auswirkungen der Globin-Knockouts außerdem auf molekularer Ebene untersucht werden. Dazu wäre es sinnvoll, die Transkriptome der Knockout-Fliegen und der Kontrollen zu sequenzieren und differentiell regulierte Gene zu identifizieren. Dies würde einen sensitiveren Einblick ermöglichen, da stärkere phänotypische Effekte möglicherweise durch die Regulation anderer Gene kompensiert werden. Interessant wäre hier zum Beispiel die differenzielle Expression von Genen, die an antioxidativen Mechanismen oder an Signaltransduktionswegen beteiligt sind.

4.4 Funktionsanalyse des Glob1 von *Drosophila melanogaster*

Das Glob1 ist das am besten untersuchte Globin von *Drosophila melanogaster*, dennoch ist auch die Frage nach der genauen Funktion dieses Proteins weiterhin unbeantwortet. Zur Klärung dieser Frage sind daher weitere Untersuchungen notwendig.

4.4.1 Gen-Knockout durch CRISPR/Cas9: Effizienz vs. Spezifität

Durch die CRISPR/Cas9-Methode konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich Fliegen mit vererbbaarem Knockout von Glob1 generiert werden, die für nachfolgende phänotypische Analysen zur Funktionsaufklärung des Glob1 verwendet werden können. Die verwendete CRISPR/Cas9-Technik ist die neueste unter den Methoden zur Genomeditierung (Jinek et al. 2012). Aufgrund der Flexibilität und der geringen Kosten dieser Methode wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von CRISPR/Cas9-Experimenten in verschiedenen Spezies durchgeführt (Doudna und Charpentier 2014; Hsu et al. 2014). Auch bei *Drosophila melanogaster* wurde CRISPR/Cas9 in vielen Arbeiten erfolgreich angewendet und so die Methode auch für diesen

Modellorganismus optimiert (Bassett und Liu 2014; Xu et al. 2015). Als entscheidend für den Erfolg eines CRISPR/Cas9-Experimentes können zwei Faktoren betrachtet werden: die Mutationseffizienz und die Spezifität.

Effizienz des Experimentes

Die Mutationseffizienz war in dem von mir durchgeführten Experiment gering. So kam es nur an einer der beiden Zielsequenzen zu Deletionen und auch hier nur zu seltenen Mutationsereignissen. Für den Knockout des *Glob1* war dies ausreichend, für mögliche folgende Experimente, wie den gleichzeitigen Knockout von *Glob2* und *Glob3*, wäre aber eine höhere Effizienz erstrebenswert. Es stellt sich daher die Frage, wie die Mutationseffizienz gesteigert werden kann. Hierbei ist zu beachten, dass bereits beim Design des Experimentes darauf geachtet wurde, eine möglichst hohe Mutationseffizienz zu erreichen: Für den Knockout von *Glob1* wurden transgene Fliegen, die Cas9 bzw. gRNAs transkribieren, miteinander gekreuzt. Die Weibchen trugen hierbei auf X-chromosomal die unter der Kontrolle des *nos*-Promotors stehende Cas9-CDS, die Männchen ein auf dem zweiten Chromosom integriertes pCFD5-Plasmid, durch das unter der Kontrolle des U6:3-Promotors zwei gRNAs transkribiert wurden (Port und Bullock 2016). Das pCFD5-Plasmid zeichnet aus, dass die gRNAs auf dem Plasmid durch tRNA-Sequenzen miteinander verbunden sind und nach der Transkription durch Prozessierung der tRNAs vereinzelt werden (Xie et al. 2015; Port und Bullock 2016). Durch den pCFD5-Vektor werden dadurch alle gRNAs zusammen vom U6:3-Promotor aus transkribiert, welcher sich als besonders starker Promotor erwiesen hat (Port et al. 2014). Bei der Verwendung von vier verschiedenen gRNAs konnten von Port und Bullock auf diese Weise bei jeder der vier Zielsequenzen somatische Mutationsraten zwischen 30% und 90% erreicht werden. 17% der Fliegen wiesen gar an allen vier Orten Mutationen auf (Port und Bullock 2016). Neben somatischen Deletionen konnten mittels Keimbahn-spezifischer Transkription von Cas9 durch den *nos*-Promotor auch sehr effizient vererbliche Mutationen erzeugt werden (Kondo und Ueda 2013; Ren et al. 2013). Es zeigte sich hierbei, dass die vorherige Integration des *nos*-Cas9-Elements in das Genom eine deutliche Steigerung der Mutationshäufigkeit gegenüber einer direkten Injektion von Cas9- und gRNA-Plasmiden bewirkt (Ren et al. 2013). Als sehr effizient erwies sich auch die Kreuzung zweier transgener Stämme, die ein *nos*- Cas9-, bzw. ein U6-gRNA-Konstrukt in ihrem Genom integriert haben

(Kondo und Ueda 2013). Dadurch entstehen doppeltransgene Fliegen, in deren Keimbahn es zu Mutationsereignissen und schließlich mutierten Nachkommen kommen kann. Verschiedene gRNAs mit unterschiedlichen autosomalen Zielgenen wiesen dabei teils sehr hohe, aber auch sehr schwankende Mutationsraten zwischen 98% (45 von 46 getesteten Nachkommen mutiert) und 9% (4 von 46 getesteten Nachkommen mutiert) auf (Kondo und Ueda 2013). Mit der gleichen Methode der Kreuzung transgener Stämme konnte in dieser Arbeit nur eine geringe Mutationsrate des Glob1-Gens erreicht werden. Von 77 Stämmen, die aus einzelnen potentiell mutierten Männchen etabliert wurden, wiesen nur zwei eine Mutation an der ersten Zielsequenz auf. Die zweite Zielsequenz war dagegen in keinem der 77 Fälle mutiert. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass bei der Generierung der Stämme aus einzelnen Nachkommen auf das zuvor isogenisierte Chromosom 3 selektiert wurde. Mögliche Mutationsereignisse auf dem homologen Chromosom 3 wurden somit nicht erfasst. Ein Grund für die dennoch geringe Mutationseffizienz könnte auch im GC-Gehalt der gRNAs liegen. Ren et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen dem GC-Gehalt in den letzten sechs Basen vor dem PAM-Motiv und der Häufigkeit von Mutationsereignissen auf. Danach wiesen gRNAs mit einem GC-Gehalt von 50% oder weniger in den letzten 6 Basen eine Mutationseffizienz von 10% bis 60% auf, während die Mutationsrate von gRNAs mit höherem GC-Gehalt zwischen 60% und 98% lag (Ren et al. 2014). Bei den beiden in dieser Arbeit verwendeten gRNAs sind jeweils drei der sechs vor dem PAM-Motiv liegenden Basen ein Cytosin bzw. ein Guanin. Eine möglicherweise dadurch bedingte geringere Effizienz wurde aber in Kauf genommen, um die Gefahr möglicher off-target-Mutationen zu minimieren, da die gewählten Sequenzen gegenüber anderen möglichen Zielsequenzen eine höhere prognostizierte Spezifität aufwiesen.

Spezifität des Experimentes

Ein grundsätzliches Problem der CRISPR/Cas9-Methode, sowie auch anderer sequenzspezifischer Methoden der Genomeditierung, ist die Gefahr von off-target-Mutationen, also ungewollten Mutationen an anderen Stellen des Genoms (Fu et al. 2013; Zhang et al. 2015). Ein wichtiger Punkt bei der Durchführung eines CRISPR-Experimentes ist es daher, die Spezifität der gRNAs zu erhöhen und so die Gefahr von off-target-Mutationen zu minimieren. Es wurden daher in diesem Experiment verkürzte gRNAs mit einer 18 Nukleotide

langen Erkennungssequenz verwendet, da gezeigt werden konnte, dass diese eine höhere Spezifität gegenüber den häufig verwendeten 20 Nukleotide langen Zielsequenzen aufweisen, ohne dass die Mutationseffizienz an der Zielregion beeinflusst wird (Fu et al. 2014; Ren et al. 2014). Um möglichst spezifische gRNAs zu verwenden, wurde das gesamte Genom von *Drosophila melanogaster* nach ähnlichen potentiellen off-target-Bereichen bioinformatisch abgesucht. Hierbei ist zu beachten, dass zur Aktivierung der verwendeten Cas9-Nuklease aus *Streptococcus pyogenes* ein drei Basen langes PAM-Motiv (NGG) am 3'-Ende der Zielsequenz im Genom benötigt wird. Neben dem Motiv NGG wird allerdings mit einer um ein Fünftel verringerten Effizienz auch das alternative Motiv NAG von der Cas9-Nuklease akzeptiert (Hsu et al. 2013; Jiang et al. 2013). Bei der Suche nach potentiellen off-target-Zielen wurden daher auch Sequenzen mit nachfolgendem NAG-Motiv berücksichtigt. Für *Drosophila* konnte experimentell gezeigt werden, dass bei einer 20 Basen langen Erkennungssequenz drei Fehlpaarungen ausreichen, um jegliche CRISPR-vermittelten Mutationen zu verhindern. Bei einer verkürzten, 18 Basen langen Zielsequenz kommt es meist sogar schon bei einer Fehlpaarung zu keinen Mutationen (Ren et al. 2014). Für eine der beiden hier verwendeten gRNAs konnte kein einziger potentieller off-target-Bereich mit drei oder weniger Fehlpaarungen im Genom identifiziert werden. Für die zweite gRNA existieren drei Bereiche im Genom, die jeweils drei Fehlpaarungen aufweisen. Hiervon liegt allerdings nur einer auf dem 3. Chromosom. Da im Zuge der späteren Etablierung der Stämme außer dem 3. Chromosom alle anderen ursprünglichen Chromosomen der mutierten Fliege herausgekreuzt werden, sind mögliche off-target-Ereignisse auf diesen Chromosomen nicht relevant. Unter der Berücksichtigung, dass bei verkürzten Zielsequenzen meist eine Fehlpaarung ausreicht, um Mutationen zu verhindern, ist aber auch auf dem 3. Chromosom nicht mit einer off-target-Mutation zu rechnen. Hinzu kommt, dass sich eine der drei Fehlpaarungen im Bereich der sechs dem PAM-Motiv am nächsten liegenden Basen befindet. Es konnte gezeigt werden, dass Fehlpaarungen an Positionen nahe des PAM-Motivs einen besonders starken negativen Einfluss auf die Mutationseffizienz haben (Fu et al. 2013; Pattanayak et al. 2013; Wu et al. 2014). Die beiden verwendeten gRNAs sollten daher sehr spezifisch sein. Auch unter Berücksichtigung der beobachteten geringen Mutationseffizienz an den Zielbereichen, sind ungewollte off-target-Mutationen an anderen Stellen des Genoms demnach nicht zu erwarten. Zur Absicherung wäre es aber auch möglich, die gesamten Genome der Knockout-Fliegen und der Kontrollen zu sequenzieren.

4.4.2 Das Ziel: Phänotypische Analyse des Glob1-Knockouts

Etablierung von Kontrollen für die phänotypische Analyse

Für die phänotypische Analyse der Knockoutstämme ist es unabdingbar, sicherzustellen, dass ein beobachteter, veränderter Phänotyp auf den Knockout zurückzuführen ist. Hierfür sind bestimmte Vorkehrungen und das Mitführen von geeigneten Kontrollen notwendig. Zunächst ist es wichtig zu vermeiden, dass das Chromosom, auf dem sich das Zielgen befindet, rezessive Mutationen trägt, die im homozygoten Zustand zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen, wie Sterilität oder Letalität der Fliegen führen. Durch die Erzeugung von Stämmen mit homozygoter Glob1-Deletion wird das dritte Chromosom der Fliegen isogenisiert. Dies bedeutet, dass alle Fliegen des Stammes homozygot für eines der beiden homologen dritten Chromosomen eines einzelnen männlichen Vorfahrens sind. Um sicherzustellen, dass dieses keine folgenschwere Mutation trägt, wurde daher bereits im Vorfeld das dritte Chromosom der Cas9-tragenden Fliegen isogenisiert und beobachtet, ob die Fliegen auffällige Beeinträchtigungen aufwiesen. Die so isogenisierten Fliegen wurden im Anschluss verwendet, um durch Kreuzung Fliegen zu generieren, die sowohl Cas9, als auch die gRNA exprimieren (vgl. Kondo und Ueda 2013). In diesen *Founder*-Tieren konnte es nun in der Keimbahn zu Cas9-vermittelten Deletionen kommen, wodurch einige der Nachkommen ein mutiertes Glob1-Gen trugen. Es wurden mehrere *Founder*-Männchen einzeln mit geeigneten Balancer-Weibchen gekreuzt und die männlichen potentiell mutierten Nachkommen wiederum einzeln zur Generierung von Stämmen vermehrt. Anschließend wurden diese Stämme auf Mutationen innerhalb des Glob1-Gens getestet. Wies einer dieser Stämme eine Mutation auf, wurde ein weiterer nicht mutierter Stamm, der aus dem gleichen *Founder*-Männchen hervorgegangen war, zusätzlich ausgewählt. Dieser Stamm weist mit Ausnahme des Glob1-Gens den identischen genetischen Hintergrund auf wie der mutierte Stamm und eignet sich daher als optimaler Kontrollstamm für die phänotypischen Versuche. Zusätzlich steht ein transgener Stamm mit einem UAS-Glob1-Element zur Verfügung, durch den nach Kreuzung mit einer Gal4-Linie eine Überexpression des Glob1 erzeugt werden kann. Dies kann genutzt werden, um weitere Kontrollfliegen zu generieren, deren Glob1-Knockout durch eine exogene Expression von Glob1 ausgeglichen wird. Sollte ein Phänotyp in den Knockoutfliegen, aber in keiner der Kontrollen beobachtet werden, könnte dadurch mit sehr großer Wahrscheinlichkeit gesagt werden, dass dieser tatsächlich durch den Knockout des Glob1 verursacht wurde.

Durchführung der phänotypischen Versuche

Es steht somit nun ein ideales Knockout-System aus Fliegen mit inaktivem Glob1 und geeigneten Kontrollen für die funktionelle Analyse von Glob1 zur Verfügung. Dieses System bietet die Möglichkeit, die sich teils widersprechenden Ergebnisse aus früheren Knockdown-Versuchen zu überprüfen (Yadav et al. 2015; Gleixner et al. 2016; Yadav und Sarkar 2016; Yadav et al. 2018). Die Experimente sollten dabei möglichst unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen durchgeführt werden. In einem ersten Schritt sollte der Einfluss des Knockouts auf die Entwicklung und die Lebensdauer analysiert werden. Hier wurde bereits unter Normoxie eine verzögerte Entwicklung und verkürzte Lebensdauer bei Fliegen mit verringerter Glob1-Expression beobachtet (Yadav et al. 2015). In einer anderen Studie trat dagegen lediglich unter hypoxischen Bedingungen eine reduzierte Lebensdauer bei Fliegen mit Glob1-Knockdown auf (Gleixner et al. 2016). Neben der allgemeinen Ontogenese der Fliegen sollte außerdem die Entwicklung der Tracheen als Hauptexpressionsort von Glob1 genauer untersucht werden (Hankeln et al. 2002). Des Weiteren wurde ein negativer Einfluss des Glob1-Knockdowns auf die Entwicklung des Aktin-basierten Cytoskeletts, insbesondere in der Oogenese postuliert (Yadav und Sarkar 2016; Yadav et al. 2018). Daher sollte auch in den Knockout-Fliegen die morphologische Entwicklung der Ovarien beobachtet werden und das Aktin-basierte Cytoskelett in den Ovarien und in anderen Geweben durch Phalloidin gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert werden. Darüber hinaus wurde eine Zunahme der Glob1-Expression unter Hyperoxie nachgewiesen, was für eine Schutzfunktion vor ROS sprechen könnte (Gleixner et al. 2008). Dem entsprechend wurde nach Knockdown von Glob1 ein erhöhtes ROS-Niveau in larvalem Gewebe beobachtet (Yadav et al. 2015). Gegen eine Schutzfunktion vor ROS spricht allerdings, dass Knockdown-Fliegen, die einem durch das Herbizid Paraquat induziertem oxidativen Stress ausgesetzt waren, keine erhöhten, durch ROS verursachten Schäden aufwiesen (Gleixner et al. 2016). Ähnlich, wie für Glob2 und Glob3 vorgeschlagen, sollten auch hier zur Klärung der Frage, ob Glob1 vor ROS schützt, verschiedene Gewebe mit dem ROS-Indikator DHE gefärbt werden und ROS-Schäden an Zellmembran und DNA ermittelt werden (siehe Kap. 4.3). Zusätzlich sollten auch beim Glob1-Knockout differentiell regulierte Gene zwischen den transgenen Fliegen und den Kontrollen durch Transkriptionsanalysen identifiziert werden, um dadurch weitere Hinweise auf die Funktion von Glob1 zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Globine sind kleine Hämoproteine, die reversibel O₂ und andere gasförmige Liganden binden können. Sie treten in allen Ordnungen der Lebewesen auf und ihre Funktionen gehen dabei weit über die bekannte respiratorische Rolle als Sauerstofflieferant hinaus. Trotz der weiten Verbreitung im Tierreich und der funktionellen Flexibilität wurde lange angenommen, dass sie in Arthropoden nur in wenigen unter besonders sauerstoffarmen Bedingungen lebenden Arten vorkommen. Ausgehend von der Entdeckung dreier Globine in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und weiterer Globin-Kopien in einer Reihe weiterer Arthropoden wuchs die Erkenntnis, dass Globine in Arthropoden weiter verbreitet sein könnten, als ursprünglich angenommen. Bislang fehlte es aber an umfassender Kenntnis über die Verbreitung, Evolution und Diversität von Globinen in dieser sehr artenreichen und ökologisch vielfältigen Tiergruppe.

Durch die systematische Suche nach Globinen in öffentlich zugänglichen genomischen und transkriptomischen Daten konnte in dieser Arbeit nun erstmals gezeigt werden, dass Globine tatsächlich zum Genrepertoire aller Arthropoden gehören. Phylogenetische Analysen dieser Proteinsequenzen zeigten, dass sich die Globine dabei in drei Hauptgruppen einteilen lassen: die evolutionär ancestralen und sehr konservierten GbX (GlobinX) und GbXL (GlobinX-like), sowie die variableren HbL (Hemoglobin-like). In einigen Arten wurden zudem Kopien des Androglobin (Adgb) gefunden. Diese vier Globin-Typen decken sich mit den Globin-Linien der Deuterostomier. Dies zeigt, dass sie evolutionär bereits sehr früh, d.h. vor der Aufspaltung der Deuterostomier und Protostomier entstanden sein müssen.

Alle GbX und GbXL, aber auch einige HbL weisen Sequenzmotive auf, die auf N-terminale posttranslationale Acylierungen und eine dadurch bedingte Membranbindung dieser Globine hindeuten. Die Verteilung dieser Acylierungsmotive spricht dafür, dass die Membranbindung eine ancestrale Eigenschaft von Globinen ist und die konservierten GbX und GbXL daher vermutlich sehr ursprüngliche Funktionen haben. Expressionsanalysen weisen auf eine Funktion in neuronalen Geweben hin. Möglicherweise sind GbX und GbXL hier an neuronalen Signalwegen beteiligt.

Als Vertreter der variablen HbL wurden die Globine des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* funktionell untersucht. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf den in den Testes von Männchen exprimierten Glob2 und Glob3. Durch die phänotypische Analyse von Fliegen mit modulierter Transkription von Glob2 und 3 konnte eine Rolle in der Spermatogenese bestätigt werden. Die spezifische Funktion dieser beiden Globine könnte etwa in einer Redox-vermittelten Signalfunktion, im Schutz vor ROS oder in der Sauerstoffversorgung während der Spermatogenese liegen.

Zur zukünftigen funktionellen Analyse des Glob1 von *Drosophila melanogaster* konnten zudem mit Hilfe der CRISPR/Cas-Methodik erfolgreich Fliegen mit einem genetischen Knockout von Glob1 generiert werden.

6 Literatur

- Abascal F, Zardoya R & Posada D** (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, **21**,2104-2105.
- Aitken RJ & Roman SD** (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **636**,154-171.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**,3389-3402.
- Arama E, Agapite J & Steller H** (2003) Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Developmental Cell*, **4**,687-697.
- Arama E, Bader M, Rieckhof GE & Steller H** (2007) A ubiquitin ligase complex regulates caspase activation during sperm differentiation in *Drosophila*. *PLoS Biology*, **5**,e251.
- Bailly X & Vinogradov SN** (2008) The Bilatarians Sea Urchin and the Radial Starlet Sea Anemone Globins Share Strong Homologies with Vertebrate Neuroglobins. In: *Dioxygen Binding and Sensing Proteins: A Tribute to Beatrice and Jonathan Wittenberg* eds Bolognesi M, di Prisco G & Verde C) Milano, Springer Milan, 191-201.
- Bajusz C, Borkuti P, Kristo I, Kovacs Z, Abonyi C & Vilmos P** (2018) Nuclear actin: ancient clue to evolution in eukaryotes? *Histochemistry and Cell Biology*.
- Bassett AR & Liu JL** (2014) CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *J Genet Genomics*, **41**,7-19.
- Birnboim HC & Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**,1513-1523.
- Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F & Basler K** (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**,3312-3317.
- Blank M & Burmester T** (2012) Widespread occurrence of N-terminal acylation in animal globins and possible origin of respiratory globins from a membrane-bound ancestor. *Molecular Biology and Evolution*, **29**,3553-3561.
- Blank M, Wollberg J, Gerlach F, Reimann K, Roesner A, Hankeln T, Fago A, Weber RE & Burmester T** (2011) A membrane-bound vertebrate globin. *PLoS One*, **6**,e25292.
- Bologna G, Yvon C, Duvaud S & Veuthey AL** (2004) N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics*, **4**,1626-1632.
- Bolognesi M, Bordo D, Rizzi M, Tarricone C & Ascenzi P** (1997) Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Progress in biophysics and molecular biology*, **68**,29-68.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**,248-254.

- Brandes RP, Weissmann N & Schroder K** (2014) Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology & Medicine*, **76**,208-226.
- Brink NG** (1968) Protein synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, **5**,192-194.
- Burmester T** (2002) Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp Physiol B*, **172**,95-107.
- Burmester T** (2015) Evolution of Respiratory Proteins across the Pancrustacea. *Integr Comp Biol*, **55**,792-801.
- Burmester T, Ebner B, Weich B & Hankeln T** (2002) Cytochrome b: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Molecular Biology and Evolution*, **19**,416-421.
- Burmester T & Hankeln T** (1999) A globin gene of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, **16**,1809-1811.
- Burmester T & Hankeln T** (2007) The respiratory proteins of insects. *Journal of Insect Physiology*, **53**,285-294.
- Burmester T & Hankeln T** (2014) Function and evolution of vertebrate globins. *Acta Physiologica*, **211**,501-514.
- Burmester T, Klawitter S & Hankeln T** (2007) Characterization of two globin genes from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: divergent origin of nematoceran haemoglobins. *Insect Molecular Biology*, **16**,133-142.
- Burmester T, Storf J, Hasenjager A, Klawitter S & Hankeln T** (2006) The hemoglobin genes of *Drosophila*. *FEBS Journal*, **273**,468-480.
- Burmester T, Wawrowski A, Diepenbruck I, Schrick K, Seiwert N, Ripp F, Prothmann A & Hankeln T** (2017) Divergent roles of the *Drosophila melanogaster* globins. *Journal of Insect Physiology*, **106**,224-231.
- Burmester T, Weich B, Reinhardt S & Hankeln T** (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, **407**,520-523.
- Casal J, Gonzalez C, Wandosell F, Avila J & Ripoll P** (1990) Abnormal meiotic spindles cause a cascade of defects during spermatogenesis in asp males of *Drosophila*. *Development*, **108**,251-260.
- Castrillon DH, Gonczy P, Alexander S, Rawson R, Eberhart CG, Viswanathan S, DiNardo S & Wasserman SA** (1993) Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics*, **135**,489-505.
- Christensen AB, Herman JL, Elphick MR, Kober KM, Janies D, Linchangco G, Semmens DC, Bailly X, Vinogradov SN & Hoogewijs D** (2015) Phylogeny of Echinoderm Hemoglobins. *PLoS One*, **10**,e0129668.
- Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, Thomas WK, Tucker A, Oakley TH, Tokishita S, Aerts A, Arnold GJ, Basu MK, Bauer DJ, Caceres CE, Carmel L, Casola C, Choi JH, Detter JC, Dong Q, Dusheyko S, Eads BD, Frohlich T, Geiler-Samerotte KA, Gerlach D, Hatcher P, Jogdeo S, Krijgsveld J, Kriventseva EV, Kultz D, Laforsch C, Lindquist E, Lopez J, Manak JR, Muller J, Pangilinan J,**

- Patwardhan RP, Pitluck S, Pritham EJ, Rechtsteiner A, Rho M, Rogozin IB, Sakarya O, Salamov A, Schaack S, Shapiro H, Shiga Y, Skalitzky C, Smith Z, Souvorov A, Sung W, Tang Z, Tsuchiya D, Tu H, Vos H, Wang M, Wolf YI, Yamagata H, Yamada T, Ye Y, Shaw JR, Andrews J, Crease TJ, Tang H, Lucas SM, Robertson HM, Bork P, Koonin EV, Zdobnov EM, Grigoriev IV, Lynch M & Boore JL (2011) The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*, **331**,555-561.
- Corti P, Xue J, Tejero J, Wajih N, Sun M, Stolz DB, Tsang M, Kim-Shapiro DB & Gladwin MT (2016) Globin X is a six-coordinate globin that reduces nitrite to nitric oxide in fish red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**,8538-8543.
- Csik L (1940) The susceptibility to oxygen want of different *Drosophila* species. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, **27**,304-310.
- Dale CS, Pagano Rde L & Rioli V (2005) Hemopressin: a novel bioactive peptide derived from the alpha1-chain of hemoglobin. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100 Suppl 1**,105-106.
- De Henau S & Braeckman BP (2016) Globin-based redox signaling. *Worm*, **5**,e1184390.
- De Henau S, Tilleman L, Vangheel M, Luyckx E, Trashin S, Pauwels M, Germani F, Vlaeminck C, Vanfleteren JR, Bert W, Pesce A, Nardini M, Bolognesi M, De Wael K, Moens L, Dewilde S & Braeckman BP (2015) A redox signalling globin is essential for reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*, **6**,8782.
- de Sanctis D, Dewilde S, Vorrhein C, Pesce A, Moens L, Ascenzi P, Hankeln T, Burmester T, Ponassi M, Nardini M & Bolognesi M (2005) Bishistidyl heme hexacoordination, a key structural property in *Drosophila melanogaster* hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, **280**,27222-27229.
- Dewilde S, Blaxter M, Van Hauwaert ML, Van Houte K, Pesce A, Griffon N, Kiger L, Marden MC, Vermeire S, Vanfleteren J, Esmans E & Moens L (1998) Structural, functional, and genetic characterization of *Gastrophilus* hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, **273**,32467-32474.
- Dewilde S, Ebner B, Vinck E, Gilany K, Hankeln T, Burmester T, Kreiling J, Reinisch C, Vanfleteren JR, Kiger L, Marden MC, Hundahl C, Fago A, Van Doorslaer S & Moens L (2006) The nerve hemoglobin of the bivalve mollusc *Spisula solidissima*: molecular cloning, ligand binding studies, and phylogenetic analysis. *Journal of Biological Chemistry*, **281**,5364-5372.
- Dickerson RE & Geis I (1983) Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology. *Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.*
- Dickinson BC & Chang CJ (2011) Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*, **7**,504-511.
- Dixon B & Pohajdak B (1992) Did the ancestral globin gene of plants and animals contain only two introns? *Trends in Biochemical Sciences*, **17**,485-488.
- Doudna JA & Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346**,1258096.
- Dröge J & Makalowski W (2011) Phylogenetic analysis reveals wide distribution of globin X. *Biol Direct*, **6**,54.

- Dröge J, Pande A, Englander EW & Makalowski W** (2012) Comparative genomics of neuroglobin reveals its early origins. *PLoS One*, **7**,e47972.
- Ebner B, Panopoulou G, Vinogradov SN, Kiger L, Marden MC, Burmester T & Hankeln T** (2010) The globin gene family of the cephalochordate amphioxus: implications for chordate globin evolution. *BMC Evolutionary Biology*, **10**,370.
- Edgar RC** (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**,1792-1797.
- Ertas B, Kiger L, Blank M, Marden MC & Burmester T** (2011) A membrane-bound hemoglobin from gills of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Journal of Biological Chemistry*, **286**,3185-3193.
- Fabrizio JJ, Hime G, Lemmon SK & Bazinet C** (1998) Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development*, **125**,1833-1843.
- Fago A, Mathews AJ & Brittain T** (2008) A role for neuroglobin: resetting the trigger level for apoptosis in neuronal and retinal cells. *IUBMB Life*, **60**,398-401.
- Farazi TA, Waksman G & Gordon JI** (2001) The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *Journal of Biological Chemistry*, **276**,39501-39504.
- Finkel T** (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, **194**,7-15.
- Fox HM, Gilchrist BM & Phear EA** (1951) Functions of haemoglobin in *Daphnia*. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, **138**,514-528.
- Freitas TA, Saito JA, Hou S & Alam M** (2005) Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **99**,23-33.
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK & Sander JD** (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, **31**,822-826.
- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM & Joung JK** (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, **32**,279-284.
- Fuchs C, Burmester T & Hankeln T** (2006) The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome. *Cytogenetic and Genome Research*, **112**,296-306.
- Fuller MT** (1998) Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **9**,433-444.
- Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR & Cho HJ** (2014) The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **817**,39-71.
- Gallagher MD & Macqueen DJ** (2017) Evolution and Expression of Tissue Globins in Ray-Finned Fishes. *Genome Biol Evol*, **9**,32-47.
- Gavrieli Y, Sherman Y & Ben-Sasson SA** (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, **119**,493-501.

- Gleixner E, Abriss D, Adryan B, Kraemer M, Gerlach F, Schuh R, Burmester T & Hankeln T (2008)** Oxygen-induced changes in hemoglobin expression in *Drosophila*. *FEBS Journal*, **275**,5108-5116.
- Gleixner E, Herlyn H, Zimmerling S, Burmester T & Hankeln T (2012)** Testes-specific hemoglobins in *Drosophila* evolved by a combination of sub- and neofunctionalization after gene duplication. *BMC Evolutionary Biology*, **12**,34.
- Gleixner E, Ripp F, Gorr TA, Schuh R, Wolf C, Burmester T & Hankeln T (2016)** Knockdown of *Drosophila* hemoglobin suggests a role in O₂ homeostasis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **72**,20-30.
- Go M (1981)** Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature*, **291**,90-92.
- Gomes I, Grushko JS, Golebiewska U, Hoogendoorn S, Gupta A, Heimann AS, Ferro ES, Scarlata S, Fricker LD & Devi LA (2009)** Novel endogenous peptide agonists of cannabinoid receptors. *FASEB Journal*, **23**,3020-3029.
- Gorr TA, Tomita T, Wappner P & Bunn HF (2004)** Regulation of *Drosophila* hypoxia-inducible factor (HIF) activity in SL2 cells: identification of a hypoxia-induced variant isoform of the HIF α homolog gene similar. *Journal of Biological Chemistry*, **279**,36048-36058.
- Götting M & Nikinmaa M (2015)** More than hemoglobin - the unexpected diversity of globins in vertebrate red blood cells. *Physiol Rep*, **3**.
- Groth AC, Fish M, Nusse R & Calos MP (2004)** Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage ϕ C31. *Genetics*, **166**,1775-1782.
- Guadagnoli JA, Braun AM, Roberts SP & Reiber CL (2005)** Environmental hypoxia influences hemoglobin subunit composition in the branchiopod crustacean *Triops longicaudatus*. *Journal of Experimental Biology*, **208**,3543-3551.
- Guerriero G, Trocchia S, Abdel-Gawad FK & Ciarcia G (2014)** Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **5**,56.
- Haddad GG, Wyman RJ, Mohsenin A, Sun Y & Krishnan SN (1997)** Behavioral and Electrophysiologic Responses of *Drosophila melanogaster* to Prolonged Periods of Anoxia. *Journal of Insect Physiology*, **43**,203-210.
- Hankeln T, Amid C, Weich B, Niessing J & Schmidt ER (1998)** Molecular evolution of the globin gene cluster E in two distantly related midges, *Chironomus pallidivittatus* and *C. thummi thummi*. *Journal of Molecular Evolution*, **46**,589-601.
- 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 (2005)** Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **99**,110-119.
- Hankeln T, Friedl H, Ebersberger I, Martin J & Schmidt ER (1997)** A variable intron distribution in globin genes of *Chironomus*: evidence for recent intron gain. *Gene*, **205**,151-160.

- Hankeln T, Jaenicke V, Kiger L, Dewilde S, Ungerechts G, Schmidt M, Urban J, Marden MC, Moens L & Burmester T** (2002) Characterization of *Drosophila* hemoglobin. Evidence for hemoglobin-mediated respiration in insects. *Journal of Biological Chemistry*, **277**,29012-29017.
- Hankeln T, Klawitter S, Kramer M & Burmester T** (2006) Molecular characterization of hemoglobin from the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, **52**,701-710.
- Hardison RC** (1996) A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**,5675-5679.
- Hedges SB, Blair JE, Venturi ML & Shoe JL** (2004) A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evolutionary Biology*, **4**,2.
- Heimann AS, Gomes I, Dale CS, Pagano RL, Gupta A, de Souza LL, Luchessi AD, Castro LM, Giorgi R, Rioli V, Ferro ES & Devi LA** (2007) Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**,20588-20593.
- Hoffmann FG, Opazo JC, Hoogewijs D, Hankeln T, Ebner B, Vinogradov SN, Bailly X & Storz JF** (2012) Evolution of the globin gene family in deuterostomes: lineage-specific patterns of diversification and attrition. *Molecular Biology and Evolution*, **29**,1735-1745.
- Holman L** (2009) *Drosophila melanogaster* seminal fluid can protect the sperm of other males. *Functional Ecology*, **23**,180-186.
- Hoogewijs D, De Henau S, Dewilde S, Moens L, Couvreur M, Borgonie G, Vinogradov SN, Roy SW & Vanfleteren JR** (2008) The *Caenorhabditis* globin gene family reveals extensive nematode-specific radiation and diversification. *BMC Evolutionary Biology*, **8**,279.
- Hoogewijs D, Ebner B, Germani F, Hoffmann FG, Fabrizius A, Moens L, Burmester T, Dewilde S, Storz JF, Vinogradov SN & Hankeln T** (2012) Androglobin: a chimeric globin in metazoans that is preferentially expressed in mammalian testes. *Molecular Biology and Evolution*, **29**,1105-1114.
- Hou S, Freitas T, Larsen RW, Piatibratov M, Sivozhelezov V, Yamamoto A, Meleshkevitch EA, Zimmer M, Ordal GW & Alam M** (2001) Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in Archaea and Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**,9353-9358.
- Hsu PD, Lander ES & Zhang F** (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, **157**,1262-1278.
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G & Zhang F** (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, **31**,827-832.
- Huelsenbeck JP & Ronquist F** (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**,754-755.
- Huh JR, Vernooy SY, Yu H, Yan N, Shi Y, Guo M & Hay BA** (2004) Multiple apoptotic caspase cascades are required in nonapoptotic roles for *Drosophila* spermatid individualization. *PLoS Biology*, **2**,E15.
- Hungerford HB** (1922) Oxyhaemoglobin present in backswimmer *Buena margaritacea* bueno (Hemiptera). *The Canadian Entomologist*, **11**,262-263.

- Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F & Marraffini LA** (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, **31**,233-239.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA & Charpentier E** (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**,816-821.
- Johnson EA & Lecomte JT** (2015) The Haemoglobins of Algae. *Advances in Microbial Physiology*, **67**,177-234.
- Kakar S, Hoffman FG, Storz JF, Fabian M & Hargrove MS** (2010) Structure and reactivity of hexacoordinate hemoglobins. *Biophysical Chemistry*, **152**,1-14.
- Kao WY, Hankeln T, Schmidt ER & Bergtrom G** (1995) Sequence and evolution of the gene for the monomeric globin I and its linkage to genes coding for dimeric globins in the insect *Chironomus thummi*. *Journal of Molecular Evolution*, **40**,354-361.
- Katoh K, Asimenos G & Toh H** (2009) Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods in Molecular Biology*, **537**,39-64.
- Katoh K & Toh H** (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, **9**,286-298.
- Kaufmann SH, Ewing CM & Shaper JH** (1987) The erasable Western blot. *Analytical Biochemistry*, **161**,89-95.
- Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S & Yoshizato K** (2001) Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *Journal of Biological Chemistry*, **276**,25318-25323.
- Kawaoka S, Katsuma S, Meng Y, Hayashi N, Mita K & Shimada T** (2009) Identification and characterization of globin genes from two lepidopteran insects, *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini*. *Gene*, **431**,33-38.
- Keilin D & Wang YL** (1946) Haemoglobin of *Gastrophilus* larvae. Purification and properties. *Biochemical Journal*, **40**,855-866.
- Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H & Phillips DC** (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, **181**,662-666.
- Koch J & Burmester T** (2016) Membrane-bound globin X protects the cell from reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **469**,275-280.
- Kondo S & Ueda R** (2013) Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, **195**,715-721.
- Kristo I, Bajusz I, Bajusz C, Borkuti P & Vilmos P** (2016) Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus. *Histochemistry and Cell Biology*, **145**,373-388.
- Kugelstadt D, Haberkamp M, Hankeln T & Burmester T** (2004) Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **325**,719-725.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**,680-685.

- Landis GN, Abdueva D, Skvortsov D, Yang J, Rabin BE, Carrick J, Tavare S & Tower J** (2004) Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**,7663-7668.
- Lankester ER** (1872) A Contribution to the Knowledge of Haemoglobin. *Proceedings of the Royal Society of London*, **21**,70-81.
- Lassmann T, Frings O & Sonnhammer EL** (2009) Kalign2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. *Nucleic Acids Research*, **37**,858-865.
- Lassmann T & Sonnhammer EL** (2005) Automatic assessment of alignment quality. *Nucleic Acids Research*, **33**,7120-7128.
- Lassmann T & Sonnhammer EL** (2006) Kalign, Kalignvu and Mumsa: web servers for multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, **34**,W596-599.
- Lesk AM & Chothia C** (1980) How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins. *Journal of Molecular Biology*, **136**,225-270.
- Lim C, Tarayrah L & Chen X** (2012) Transcriptional regulation during *Drosophila* spermatogenesis. *Spermatogenesis*, **2**,158-166.
- Linder ME & Deschenes RJ** (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**,74-84.
- Lipina C & Hundal HS** (2016) Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. *Open Biol*, **6**,150276.
- Luyckx E, Van Leuven W, Andre D, Quarta A, Reekmans K, Franssen E, Moens L, Hankeln T, Ponsaerts P & Dewilde S** (2018) Loss of Neuroglobin Expression Alters Cdkn1a/Cdk6-Expression Resulting in Increased Proliferation of Neural Stem Cells. *Stem Cells Dev*, **27**,378-390.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C & Bryant SH** (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, **43**,D222-226.
- Matthews PG & Seymour RS** (2006) Diving insects boost their buoyancy bubbles. *Nature*, **441**,171.
- Matthews PG & Seymour RS** (2008) Haemoglobin as a buoyancy regulator and oxygen supply in the backswimmer (Notonectidae, Anisops). *Journal of Experimental Biology*, **211**,3790-3799.
- Maurer-Stroh S, Eisenhaber B & Eisenhaber F** (2002) N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, **317**,541-557.
- McPartland J, Di Marzo V, De Petrocellis L, Mercer A & Glass M** (2001) Cannabinoid receptors are absent in insects. *Journal of Comparative Neurology*, **436**,423-429.
- McPartland JM, Agrawal J, Gleeson D, Heasman K & Glass M** (2006) Cannabinoid receptors in invertebrates. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**,366-373.

- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware J, Flouri T, Beutel RG, Niehuis O, Petersen M, Izquierdo-Carrasco F, Wappler T, Rust J, Aberer AJ, Aspöck U, Aspöck H, Bartel D, Blanke A, Berger S, Böhm A, Buckley TR, Calcott B, Chen J, Friedrich F, Fukui M, Fujita M, Greve C, Grobe P, Gu S, Huang Y, Jermiin LS, Kawahara AY, Krogmann L, Kubiak M, Lanfear R, Letsch H, Li Y, Li Z, Li J, Lu H, Machida R, Mashimo Y, Kapli P, McKenna DD, Meng G, Nakagaki Y, Navarrete-Heredia JL, Ott M, Ou Y, Pass G, Podsiadlowski L, Pohl H, von Reumont BM, Schütte K, Sekiya K, Shimizu S, Slipinski A, Stamatakis A, Song W, Su X, Szucsich NU, Tan M, Tan X, Tang M, Tang J, Timelthaler G, Tomizuka S, Trautwein M, Tong X, Uchifune T, Walz MG, Wiegmann BM, Wilbrandt J, Wipfler B, Wong TK, Wu Q, Wu G, Xie Y, Yang S, Yang Q, Yeates DK, Yoshizawa K, Zhang Q, Zhang R, Zhang W, Zhang Y, Zhao J, Zhou C, Zhou L, Ziesmann T, Zou S, Li Y, Xu X, Zhang Y, Yang H, Wang J, Wang J, Kjer KM & Zhou X (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, **346**,763-767.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L & Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, **5**,621-628.
- Muro I, Berry DL, Huh JR, Chen CH, Huang H, Yoo SJ, Guo M, Baehrecke EH & Hay BA (2006) The *Drosophila* caspase Ice is important for many apoptotic cell deaths and for spermatid individualization, a nonapoptotic process. *Development*, **133**,3305-3315.
- Nadolski MJ & Linder ME (2007) Protein lipidation. *FEBS Journal*, **274**,5202-5210.
- Nagai K, Luisi B, Shih D, Miyazaki G, Imai K, Poyart C, De Young A, Kwiatkowski L, Noble RW, Lin SH & et al. (1987) Distal residues in the oxygen binding site of haemoglobin studied by protein engineering. *Nature*, **329**,858-860.
- Netto LE, de Oliveira MA, Monteiro G, Demasi AP, Cussiol JR, Discola KF, Demasi M, Silva GM, Alves SV, Faria VG & Horta BB (2007) Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **146**,180-193.
- Notredame C, Higgins DG & Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, **302**,205-217.
- O'Brien A & Bailey TL (2014) GT-Scan: identifying unique genomic targets. *Bioinformatics*, **30**,2673-2675.
- Oakley TH, Wolfe JM, Lindgren AR & Zaharoff AK (2013) Phylotranscriptomics to bring the understudied into the fold: monophyletic ostracoda, fossil placement, and pancrustacean phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, **30**,215-233.
- Oberstein A, Pare A, Kaplan L & Small S (2005) Site-specific transgenesis by Cre-mediated recombination in *Drosophila*. *Nat Methods*, **2**,583-585.
- Okada K, Blount JD, Sharma MD, Snook RR & Hosken DJ (2011) Male attractiveness, fertility and susceptibility to oxidative stress are influenced by inbreeding in *Drosophila simulans*. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**,363-371.
- Olivieri G & Olivieri A (1965) Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, **2**,366-380.
- Opazo JC, Lee AP, Hoffmann FG, Toloza-Villalobos J, Burmester T, Venkatesh B & Storz JF (2015) Ancient Duplications and Expression Divergence in the Globin Gene Superfamily of

- Vertebrates: Insights from the Elephant Shark Genome and Transcriptome. *Molecular Biology and Evolution*, **32**,1684-1694.
- Owusu-Ansah E & Banerjee U** (2009) Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, **461**,537-541.
- Parker JM, Guo D & Hodges RS** (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*, **25**,5425-5432.
- Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA & Liu DR** (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*, **31**,839-843.
- Pavlopoulos A, Oehler S, Kapetanaki MG & Savakis C** (2007) The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates. *Genome Biol*, **8 Suppl 1**,S2.
- Pei J, Tang M & Grishin NV** (2008) PROMALS3D web server for accurate multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Research*, **36**,W30-34.
- Perutz MF** (1979) Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annual Review of Biochemistry*, **48**,327-386.
- Pesce A, Bolognesi M, Bocedi A, Ascenzi P, Dewilde S, Moens L, Hankeln T & Burmester T** (2002) Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Reports*, **3**,1146-1151.
- Pick C, Schneuer M & Burmester T** (2009) The occurrence of hemocyanin in Hexapoda. *FEBS Journal*, **276**,1930-1941.
- Port F & Bullock SL** (2016) Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs. *Nat Methods*, **13**,852-854.
- Port F, Chen HM, Lee T & Bullock SL** (2014) Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**,E2967-2976.
- Raychaudhuri S, Skommer J, Henty K, Birch N & Brittain T** (2010) Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death. *Apoptosis*, **15**,401-411.
- Rehm P, Pick C, Borner J, Markl J & Burmester T** (2012) The diversity and evolution of chelicerate hemocyanins. *BMC Evolutionary Biology*, **12**,19.
- Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y & Yao X** (2008) CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Engineering Design and Selection*, **21**,639-644.
- Ren X, Sun J, Housden BE, Hu Y, Roesel C, Lin S, Liu LP, Yang Z, Mao D, Sun L, Wu Q, Ji JY, Xi J, Mohr SE, Xu J, Perrimon N & Ni JQ** (2013) Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**,19012-19017.

- Ren X, Yang Z, Xu J, Sun J, Mao D, Hu Y, Yang SJ, Qiao HH, Wang X, Hu Q, Deng P, Liu LP, Ji JY, Li JB & Ni JQ** (2014) Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Rep*, **9**,1151-1162.
- Resh MD** (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1451**,1-16.
- Ripoll P, Pimpinelli S, Valdivia MM & Avila J** (1985) A cell division mutant of *Drosophila* with a functionally abnormal spindle. *Cell*, **41**,907-912.
- Rockstroh M, Müller S, Jende C, Kerzhner A, von Bergen M & Tomm JM** (2011) Cell fractionation - an important tool for compartment proteomics. *Journal of Integrated Omics*, **1**,135-143.
- Roesner A, Fuchs C, Hankeln T & Burmester T** (2005) A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. *Molecular Biology and Evolution*, **22**,12-20.
- Roesner A, Hankeln T & Burmester T** (2006) Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology*, **209**,2129-2137.
- Rogozin IB, Carmel L, Csuros M & Koonin EV** (2012) Origin and evolution of spliceosomal introns. *Biol Direct*, **7**,11.
- Rollett A** (1861) Zur Kenntnis der Verbreitung des Hämatins. *Sitzungsberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften zu Wien*, **44**,615-630.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP** (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**,1572-1574.
- Roy SW & Gilbert W** (2006) The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress. *Nature Reviews Genetics*, **7**,211-221.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LS, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJ, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Vossball LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH & Lewis S** (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, **287**,2204-2215.
- Salinovich O & Montelaro RC** (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **156**,341-347.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**,5463-5467.
- Sasselli V, Pachnis V & Burns AJ** (2012) The enteric nervous system. *Developmental Biology*, **366**,64-73.
- Schmidt H, Greshake B, Feldmeyer B, Hankeln T & Pfenninger M** (2013) Genomic basis of ecological niche divergence among cryptic sister species of non-biting midges. *BMC Genomics*, **14**,384.

- Schwarze K, Campbell KL, Hankeln T, Storz JF, Hoffmann FG & Burmester T** (2014) The globin gene repertoire of lampreys: convergent evolution of hemoglobin and myoglobin in jawed and jawless vertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, **31**,2708-2721.
- Schwarze K, Singh A & Burmester T** (2015) The Full Globin Repertoire of Turtles Provides Insights into Vertebrate Globin Evolution and Functions. *Genome Biol Evol*, **7**,1896-1913.
- Schweikert E** (2009) Funktionelle Charakterisierung von Globin 2 und 3 in Drosophila. Diplomarbeit. IOME, Universität Mainz.
- Shi J, Blundell TL & Mizuguchi K** (2001) FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *Journal of Molecular Biology*, **310**,243-257.
- Sigrist CJ, Cerutti L, Hulo N, Gattiker A, Falquet L, Pagni M, Bairoch A & Bucher P** (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in Bioinformatics*, **3**,265-274.
- Smaghe BJ, Hoy JA, Percifield R, Kundu S, Hargrove MS, Sarath G, Hilbert JL, Watts RA, Dennis ES, Peacock WJ, Dewilde S, Moens L, Blouin GC, Olson JS & Appleby CA** (2009) Review: correlations between oxygen affinity and sequence classifications of plant hemoglobins. *Biopolymers*, **91**,1083-1096.
- Snook RR & Hosken DJ** (2004) Sperm death and dumping in Drosophila. *Nature*, **428**,939-941.
- Springer BA, Sligar SG, Olson JS & Phillips GN, Jr.** (1994) Mechanisms of Ligand Recognition in Myoglobin. *Chemical Reviews*, **94**,699-714.
- Stamatakis A, Hoover P & Rougemont J** (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*, **57**,758-771.
- Stekel DJ, Git Y & Falciani F** (2000) The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries. *Genome Research*, **10**,2055-2061.
- Stoltzfus A & Ford Doolittle W** (1993) Molecular evolution: slippery introns and globin gene evolution. *Current Biology*, **3**,215-217.
- Storz JF, Opazo JC & Hoffmann FG** (2013) Gene duplication, genome duplication, and the functional diversification of vertebrate globins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **66**,469-478.
- Stranzl GR, Santelli E, Bankston LA, La Clair C, Bobkov A, Schwarzenbacher R, Godzik A, Perego M, Grynberg M & Liddington RC** (2011) Structural insights into inhibition of Bacillus anthracis sporulation by a novel class of non-heme globin sensor domains. *Journal of Biological Chemistry*, **286**,8448-8458.
- Tejero J & Gladwin MT** (2014) The globin superfamily: functions in nitric oxide formation and decay. *Biological Chemistry*, **395**,631-639.
- Tilleman L, Germani F, De Henau S, Geuens E, Hoogewijs D, Braeckman BP, Vanfleteren JR, Moens L & Dewilde S** (2011) Globins in Caenorhabditis elegans. *IUBMB Life*, **63**,166-174.
- Tokuyasu KT, Peacock WJ & Hardy RW** (1972) Dynamics of spermiogenesis in Drosophila melanogaster. I. Individualization process. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, **124**,479-506.

- Trent JT & Hargrove MS** (2002) A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, **277**,19538-19545.
- Trewitt PM, Luhm RA, Samad F, Ramakrishnan S, Kao WY & Bergtrom G** (1995) Molecular evolutionary analysis of the YWVZ/7B globin gene cluster of the insect *Chironomus thummi*. *Journal of Molecular Evolution*, **41**,313-328.
- Vazquez-Limon C, Hoogewijs D, Vinogradov SN & Arredondo-Peter R** (2012) The evolution of land plant hemoglobins. *Plant Sci*, **191-192**,71-81.
- Vinogradov SN, Bailly X, Smith DR, Tinajero-Trejo M, Poole RK & Hoogewijs D** (2013a) Microbial eukaryote globins. *Advances in Microbial Physiology*, **63**,391-446.
- Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Arredondo-Peter R, Guertin M, Gough J, Dewilde S, Moens L & Vanfleteren JR** (2005) Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**,11385-11389.
- Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Mizuguchi K, Dewilde S, Moens L & Vanfleteren JR** (2007) A model of globin evolution. *Gene*, **398**,132-142.
- Vinogradov SN & Moens L** (2008) Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing. *Journal of Biological Chemistry*, **283**,8773-8777.
- Vinogradov SN, Tinajero-Trejo M, Poole RK & Hoogewijs D** (2013b) Bacterial and archaeal globins - a revised perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1834**,1789-1800.
- Wang C & Lehmann R** (1991) Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell*, **66**,637-647.
- Wawrowski A, Matthews PG, Gleixner E, Kiger L, Marden MC, Hankeln T & Burmester T** (2012) Characterization of the hemoglobin of the backswimmer *Anisops deanei* (Hemiptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **42**,603-609.
- Weber RE, Braunitzer G & Kleinschmidt T** (1985) Functional multiplicity and structural correlations in the hemoglobin system of larvae of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera): Hb components CTT I, CTT II beta, CTT III, CTT IV, CTT VI, CTT VII B, CTT IX and CTT X. *Comp Biochem Physiol B*, **80**,747-753.
- Weber RE & Vinogradov SN** (2001) Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiological Reviews*, **81**,569-628.
- White-Cooper H** (2004) Spermatogenesis: analysis of meiosis and morphogenesis. *Methods in Molecular Biology*, **247**,45-75.
- White-Cooper H, Schafer MA, Alphey LS & Fuller MT** (1998) Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*. *Development*, **125**,125-134.
- Wittenberg JB** (1970) Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. *Physiological Reviews*, **50**,559-636.

- Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, Cheng AW, Trevino AE, Konermann S, Chen S, Jaenisch R, Zhang F & Sharp PA** (2014) Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, **32**,670-676.
- Xie K, Minkenberg B & Yang Y** (2015) Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**,3570-3575.
- Xu J, Ren X, Sun J, Wang X, Qiao HH, Xu BW, Liu LP & Ni JQ** (2015) A Toolkit of CRISPR-Based Genome Editing Systems in *Drosophila*. *J Genet Genomics*, **42**,141-149.
- Yadav R, Kundu S & Sarkar S** (2015) *Drosophila* glob1 expresses dynamically and is required for development and oxidative stress response. *Genesis*, **53**,719-737.
- Yadav R, Nisha & Sarkar S** (2018) *Drosophila* globin1 is required for maintenance of the integrity of F-actin based cytoskeleton during development. *Experimental Cell Research*.
- Yadav R & Sarkar S** (2016) *Drosophila* glob1 is required for the maintenance of cytoskeletal integrity during oogenesis. *Developmental Dynamics*, **245**,1048-1065.
- Yenerall P & Zhou L** (2012) Identifying the mechanisms of intron gain: progress and trends. *Biol Direct*, **7**,29.
- Yoon J, Herzik MA, Jr., Winter MB, Tran R, Olea C, Jr. & Marletta MA** (2010) Structure and properties of a bis-histidyl ligated globin from *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry*, **49**,5662-5670.
- Yusa K** (2015) piggyBac Transposon. *Microbiol Spectr*, **3**,MDNA3-0028-2014.
- Zeis B, Becher B, Lamkemeyer T, Rolf S, Pirow R & Paul RJ** (2003) The process of hypoxic induction of *Daphnia magna* hemoglobin: subunit composition and functional properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **134**,243-252.
- Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS & Yang SH** (2015) Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids*, **4**,e264.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Adgb	Androglobin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CB	"cystic bulg"
cDNA	"complementary DNA"
CDS	"coding sequence"
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cygb	Cytoglobin
CyO	"Curly of Oyster"
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	"enhanced chemiluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ExoSAP	Exonuklease I - Shrimp Alkaline Phosphatase
FCS	"fetal calf serum"
GbE	GlobinE
GbX	GlobinX
GbXL	GlobinXL
GbY	GlobinY
GFP	"green fluorescent protein"
gRNA	"guide RNA"
Hb	Hämoglobin
HbL	hemoglobin-Like
HIF	"hypoxia inducible factor"
HPLC	"high performance liquid chromatography"
HRP	"horseradish peroxidase"
IC	"investment cone"
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

Mb	Myoglobin
ML	"maximum likelihood"
mRNA	"messenger RNA"
Ngb	Neuroglobin
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
O ₂	Sauerstoff
PAM	"protospacer adjacent motif"
PBS	"phosphate buffered saline"
PCR	"polymerase chain reaction"
Pm	"plum"
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Realtime Reverse-Transkriptase-PCR
RNAi	RNA-Interferenz
RPKM	"reads per kilobase per million mapped reads"
rpm	"revolutions per minute"
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecyl-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sp	"sternopleural"
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM3	"third multiple 3"
TM6B	"third multiple 6B"
tRNA	"transfer RNA"
TUNEL	"TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling"
V	Volumen
VE	vollentsalzt
WB	"waste bag"
w/v	weight/volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
y ch v	"yellow chocolate vermillon"

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Darstellung der Globin-Struktur	2
Abbildung 1-2. Phylogenie der ursprünglichen eindomänigen Globintypen der Metazoa	4
Abbildung 1-3. Mögliche Funktionen von Globinen	5
Abbildung 1-4. Arthropoden mit roter Färbung aufgrund starker Globin-Expression	6
Abbildung 1-5. Detektion von Glob1-mRNA durch in-situ-Hybridisierung.....	8
Abbildung 1-6. Detektion der mRNA von Glob2 (A) und Glob3 (B) in den Testes adulter Männchen durch in-situ-Hybrisisierung.....	9
Abbildung 2-1. Generierung des Glob1-gRNA-Expressionsplamids.....	30
Abbildung 3-1. Western-Blot mit Anti-Glob2-Antiköper bzw. Anti-Myc-Antikörper an Proteinextrakten aus Testes und ganzen Fliegen.....	76
Abbildung 3-2. Kontrolle der einzelnen Zellfraktionen.....	78
Abbildung 3-3. Nachweis der zellulären Lokalisation von Glob2.....	79
Abbildung 3-4. Nachweis der Globin-Überexpression in doppeltransgenen Kreuzungs- nachkommen.....	80
Abbildung 3-5. Quantifizierung der gesamten Glob2-mRNA sowie des separat gemessenen transgenen myc-Glob2 in ganzen Männchen mittels qRT-PCR.....	82
Abbildung 3-6. Die Quantifizierung der Glob2-Expression auf Protein-Ebene weist eine Verdopplung der Glob2-Proteinmenge in ganzen Männchen beider Glob2- Überexpressions-kreuzungen nach	83
Abbildung 3-7. Zusammenfassung der Quantifizierungsergebnisse der Glob2-Expression in ganzen Männchen auf RNA- und Protein-Ebene	84
Abbildung 3-8. Lebensdauer unter Normoxie.....	86
Abbildung 3-9. Lebensdauer unter Hyperoxie (O ₂ -Gehalt = 95%).....	88
Abbildung 3-10. Positionierung der transposablen Elemente innerhalb des zweiten Introns des Glob3-Gens.....	90
Abbildung 3-11. Quantifizierung der Glob3-Expression in Männchen der Stämme mit Glob3- Knockdown mittels qRT-PCR	91
Abbildung 3-12. Phasenkontrastmikroskopie an Testes von <i>Drosophila melanogaster</i>	93
Abbildung 3-13. Phasenkontrast-Mikroskopie von postmeiotischen Spermatischen ver- schiedener Glob3-Knockdown Stämme	94

Abbildung 3-14. Immunfluoreszenzfärbung von Testes-Präparaten des Stammes white ⁻	95
Abbildung 3-15. Immunfluoreszenzfärbung an Testespräparaten nach 50 Stunden Hyperoxie (95% O ₂).....	97
Abbildung 3-16. Gefärbte Spermien aus dem Samenbläschen eines Männchens des Stammes white ⁻ zur Ermittlung der Spermienviabilität	98
Abbildung 3-17. Anteil der lebenden Spermien in den Samenbläschen von Stämmen mit Glob3-Knockdown (rot) und Kontrollen mit endogener Glob3-Expression (grau)	99
Abbildung 3-18. Vergleich der Fertilität der Männchen verschiedener Stämme.....	100
Abbildung 3-19. Positionen der gRNA-Zielsequenzen mit benötigter PAM-Sequenz und der funktionell wichtigen Histidine im Exon2 des Glob1-Gens	102
Abbildung 3-20. Aufbau des pCFD5-Plasmids mit integrierten Zielsequenzen	102
Abbildung 3-21. Deletionen innerhalb des Glob1-Gens in den Stämmen Glob1DEL und Glob1KO im Vergleich zu der wildtypischen Sequenz (Glob1WT)	103
Abbildung 4-1. Auftreten von GbX und GbXL in beispielhaft ausgewählten Taxa der Bilateria.....	108
Abbildung 4-2. Übersicht über die in der Literatur angegebenen Hauptexpressionsorte von GbX in Vertebraten im Vergleich zum GbXL der Arthropoden	113
Abbildung 4-3. Unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation von Globin-GFP-Konstrukten in S2-Zellen	117

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1. Liste der verwendeten Fliegenstämme	12
Tabelle 2-2. Liste der für qRT-PCR verwendeten Primer	22
Tabelle 2-3. Liste der in den Western-Blot-Versuchen verwendeten Antikörper.	27
Tabelle 2-4. Kreuzungsschema zur Isogenisierung des Chromosoms 3 der Cas9 exprimierenden Fliegen.....	33
Tabelle 2-5. Liste der für das CRISPR-Experiment verwendeten Primer	34
Tabelle 2-6. Kreuzungsschema zur Generierung von Stämmen mit homozygoter Glob1-Mutation.....	35
Tabelle 3-1. Antigene der verwendeten Kontrollantikörper.	78

7.4 Elektronischer Anhang

Anhang zu Kapitel 3.1.

- Supplemental File 1 – List of globin sequences
- Supplemental File 2 – Amino acid sequences of globins
- Supplemental File 3 – Multiple sequence alignment used for phylogenetic analysis

Anhang zu Kapitel 3.2.4.

- Chromatogramme der Sequenzierungen zur Detektion potentieller Glob1-Mutationen

8 Danksagung

Ich danke den Gutachtern dieser Arbeit, den Mitarbeitern des ehemaligen Instituts für Genetik für ihre Hilfe bei Drosophila-Fragen, meinen Kollegen in der Molekulargenetik und allen anderen, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Nina, Karl und Nils.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel in der Arbeit angegeben habe. Ich habe die Dissertation, oder Teile davon, an keiner anderen Fakultät, bzw. einem anderen Fachbereich eingereicht. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, September 2019

Andreas Prothmann

10 Lebenslauf

Andreas Prothmann

Geburtsdatum: 10. März 1982
Geburtsort: Frankfurt am Main



Seit 07/2009

Doktorand am Institut für Organismische und Molekulare Evolutionsbiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der AG Molekulargenetik und Genomanalyse (bis 2018 Institut für Molekulargenetik)

10/2002 – 03/2009

Studium der Anthropologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit den Nebenfächern Zoologie und Soziologie
Abschluss: Magister (Note: sehr gut, 1,5)

Thema der Abschlussarbeit: „Molekulargenetische Analyse des Zusammenhangs zwischen der Sequenzevolution des Gens PH-20 und dem Sexualdimorphismus bei Primaten“ (Note: sehr gut, 1,0)

10/2001 – 09/2002

Studium der Mathematik an der Goethe-Universität Frankfurt

08/1992 – 05/2001

Georg-Büchner-Gymnasium, Bad Vilbel
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Publikationen

Prothmann A, Laube I, Dietz J, Roos C, Mengel K, Zischler H & Herlyn H (2012) Sexual size dimorphism predicts rates of sequence evolution of SPerm Adhesion Molecule 1 (SPAM1, also PH-20) in monkeys, but not in hominoids (apes including humans). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63,52-63.

Burmester T, Wawrowski A, Diepenbruck I, Schrick K, Seiwert N, Ripp F, **Prothmann A** & Hankeln T (2017) Divergent roles of the *Drosophila melanogaster* globins. *Journal of Insect Physiology*, 106,224-231.

