

Neuroglobin, Cytoglobin und Myoglobin in der Blindmaus *Spalax ehrenbergi*: Adaptation an „unterirdische Verhältnisse“

**Dissertation
zur Erlangung des Grades**

„Doktor der Naturwissenschaften“

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

Frank Gerlach

**geboren am 24. Mai 1977
in Bad Kreuznach**

Mainz, den 27.11.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2007



Blindmaus *Spalax ehrenbergi*

Inhaltsverzeichnis

Tag der Prüfung	II	
Blindmaus <i>Spalax ehrenbergi</i>	III	
Inhaltsverzeichnis	IV	
Abbildungsverzeichnis	X	
Tabellenverzeichnis	XI	
Abkürzungsverzeichnis	XII	
1	Einleitung	1
1.1	Hypoxieanpassungen in Säugetieren.....	1
1.2	Hypoxiesensitive Tiermodelle.....	4
1.2.1	Das Hausschwein als hypoxiesensitiver Organismus und als Operationsmodell	4
1.3	Hypoxietolerante Tiermodelle.....	5
1.3.1	Tauchende Säugetiere und Vögel.....	5
1.3.2	Hypoxietolerante Vögel	6
1.3.3	Schildkröten	7
1.3.4	Höhenlebende Menschen	8
1.3.5	<i>Spalax ehrenbergi</i> : ein Säuger-Tiermodell für Hypoxietoleranz.....	10
1.3.5.1	Taxonomie, Systematik und Diversität	10
1.3.5.2	Geografische Verbreitung	11
1.3.5.3	Morphologie	13
1.3.5.4	Habitat und Nahrung	14
1.3.5.5	Fortpflanzung und Verhalten	15
1.3.5.6	Physiologische und molekulare Anpassungen in <i>Spalax</i> an ein Leben unter Hypoxie	16
1.4	Globine	20
1.4.1	Neuroglobin und Cytoglobin: Proteinstruktur und Genexpression.....	23
1.4.1.1	Neuroglobin.....	23
1.4.1.2	Cytoglobin.....	25
1.4.2	Mögliche Funktionen von Neuroglobin und Cytoglobin	26

1.4.2.1	Mögliche Funktionen von Neuroglobin	26
1.4.2.2	Mögliche Funktionen von Cytoglobin	28
1.5	Zielsetzung der Arbeit	29
2	Material und Methoden	31
2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	31
2.1.1	Isolierung genomischer DNA	31
2.1.2	Verdau und Fällung von DNA	31
2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.1.5	Klonierung von PCR-Produkten und Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien	33
2.1.6	Isolierung von Gesamt-RNA	34
2.1.7	Fällung von RNA	35
2.1.8	DNase-Behandlung von Gesamt-RNA	35
2.1.9	Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA	36
2.1.10	Sequenzierung von Plasmidvektoren bzw. PCR-Produkten	36
2.1.11	Auswertung von Sequenzdaten	37
2.2	Bestimmung der Transkriptionsstart- und -endpunkte durch „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE)	37
2.2.1	Ermittlung des Transkriptionsstarts durch 5´RACE	37
2.2.2	Ermittlung des Transkriptionsendes durch 3´RACE	38
2.2.3	Ermittlung von Vollängentranskripten mit dem <i>GeneRacer Kit</i>	38
2.3	„Genome-Walking“ zur Ermittlung von Genomsequenz-Bereichen	39
2.4	Genomische Sequenzvergleiche und Berechnungen der Evolutionsraten	39
2.5	Quantitative realtime RT-PCR	40
2.5.1	Verwendete Detektionsmethoden	41
2.5.1.1	TaqMan [®] -Methode	41
2.5.1.2	SYBR-Green-Methode	42
2.5.2	Auswertung von qRT-PCR-Daten	44
2.5.2.1	Berechnung der differentiellen Genexpression mittels verschiedener Auswertemethoden ohne und mit Verwendung von Referenzgenen.	47

2.5.3	Durchführung der qRT-PCR.....	49
2.6	Pico-Green Fluorometermessung.....	52
2.7	Western Blot.....	52
2.8	Immunhistochemie.....	54
2.8.1	Peroxidasenachweis der Proteinexpression in Geweben.....	56
2.8.2	Immunfluoreszenznachweis der Proteinexpression in Geweben.....	56
2.9	Operation der Schweine in tiefer Hypothermie.....	57
2.10	Puffer und Lösungen.....	58
2.11	Verwendete Oligonukleotide.....	62
2.12	Firmenverzeichnis.....	65
3	Ergebnisse.....	66
3.1	Modellsystem Blindmaus <i>Spalax ehrenbergi</i>	66
3.1.1	Das Neuroglobin von <i>Spalax</i>	66
3.1.1.1	Genom-Organisation und molekulare Evolution des Neuroglobingens.....	66
3.1.1.2	Zelluläres Expressionsmuster von Ngb im Gehirn.....	68
3.1.1.3	Expression der Ngb-mRNA und des Proteins im Gehirn.....	71
3.1.1.3.1	Quantitative Untersuchung zur Neuroglobin-mRNA-Expression.....	71
3.1.1.3.2	Untersuchung der Neuroglobin Protein-Expression zwischen Spezies und unter Hypoxie.....	73
3.1.2	Das <i>Spalax</i> Cytoglobin (Cygb) Gen.....	75
3.1.2.1	Klonierung des Cygb-Gens aus <i>Spalax</i>	75
3.1.2.1.1	Bestimmung des Transkriptionsstart- und -endpunktes der Cygb-cDNA.....	75
3.1.2.1.2	Klonierung des <i>S. carmeli</i> (2n=58) Cygb-Gens auf Genomebene.....	76
3.1.2.2	Genomorganisation und Sequenzvergleiche des Cygb-Gens.....	77
3.1.2.2.1	Zelluläres Expressionsmuster von Cygb in verschiedenen Geweben.....	80
3.1.2.3	Quantitative Untersuchung der Cytoglobin mRNA-Expression.....	83
3.1.2.4	Quantitative Untersuchung der Cytoglobin Protein-Expression.....	86
3.1.3	Das <i>Spalax</i> Myoglobin (Mb) Gen.....	87
3.1.3.1	Isolierung und Klonierung des Mb-Gens aus <i>S. carmeli</i> (2n=58).....	87
3.1.3.2	Expression des Myoglobingens auf mRNA-Ebene im Skelett- und Herzmuskel.....	90

3.1.4	Neuroglobin und Cytoglobin im Auge von <i>Spalax</i>	91
3.1.4.1	Expressionsmuster der Proteine Ngb und Cytochrom c in der Spalax-Retina.	91
3.1.4.2	Quantitative Expressionsuntersuchung der Ngb-mRNA im Auge im Interspeziesvergleich und unter hypoxischen Bedingungen	94
3.1.4.3	Ngb Proteinexpression im Auge von Spalax.....	95
3.1.4.4	Vaskularisierung des Spalax-Auges.....	96
3.1.4.5	Lokalisation von Cygb und neuronaler NO-Synthase in der Retina von Spalax	96
3.1.4.6	Quantitative Untersuchung der Cygb-mRNA in Auge von Ratte und Spalax unter Hypoxie	98
3.2	Ngb und Cygb Expression im hypoxiesensitiven Modellorganismus Hausschwein (<i>Sus scrofa</i>)	100
3.2.1	Ngb und Cygb mRNA-Regulation nach tief hypothermem Kreislaufstillstand und Reperfusion	100
3.2.1.1	Neuroglobin-Regulation nach tief hypothermem Kreislaufstillstand	100
3.2.1.2	Cytoglobin-Regulation nach tief hypothermem Kreislaufstillstand.....	101
3.3	Entwicklung einer Methode zur Normalisierung von quantitativen Realtime RT-PCR-Daten auf Ebene der cDNA mittels PicoGreen Fluorometermessung	103
4	Diskussion	106
4.1	Neuroglobin in Spalax.....	106
4.1.1	Interspeziesvergleich von Neuroglobin: Kaum Hinweise auf Sequenzadaptation der verschiedenen <i>Spalax</i> -Spezies mit anderen Vertebraten	107
4.1.2	Neuroglobin in <i>Spalax</i> : Adaptation durch Veränderung der Genexpression.	110
4.1.3	Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen des <i>S. carmeli</i> (2n=58) Neuroglobingens: Erklärungsansätze für die verstärkte normoxische Expression	111
4.1.4	Die möglichen Funktionen des Neuroglobins.....	115
4.1.4.1	Neuroglobin als Sauerstoffspeicher und -transporter?.....	115
4.1.4.2	Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	117
4.1.4.3	NO-Dioxygenase Funktion	119

4.1.4.4	Neuroglobin in der Retina der Blindmaus: Rückschlüsse auf die Basisfunktion.....	120
4.1.4.5	Neuroglobin in Gliazellen – ein allgemeines Merkmal hypoxieresistenter Lebewesen.....	121
4.2	Das Cytoglobin in <i>Spalax</i>	122
4.2.1	Interspeziesvergleich von Cytoglobin: Wenige Hinweise auf eine Sequenzadaptation.....	122
4.2.2	Die Expression des <i>Spalax</i> Cytoglobins gibt ebenfalls Hinweise auf eine Adaptation an das Leben unter Hypoxie	124
4.2.3	Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen des <i>S. carmeli</i> (2n=58) Cytoglobingens.....	124
4.2.4	Die möglichen Funktionen des Cytoglobins	126
4.2.4.1	Cygb: Lieferant von Sauerstoff an Enzyme?	126
4.2.4.2	Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies und weitere Funktionen.....	128
4.2.5	Cytoglobin in der Retina – keine klaren Hinweise auf eine bestimmte Funktion	128
4.3	Das Myoglobin in <i>Spalax</i> - Bestätigung alter Ergebnisse und neue Erkenntnisse	129
4.4	Operationsmethoden in tiefer Hypothermie bei schweren angeborenen Herzfehlern – Hinweise auf Verbesserung der Sauerstoffverfügbarkeit?.....	130
4.4.1	Ngb in Ferkeln nach tiefer Hypothermie – Hinweise auf Sauerstoffversorgungsfunktion oder auch Neuroprotektion?	130
4.4.2	Cytoglobin beim Schwein: Keine neuen Funktionshinweise.....	131
4.5	Normalisierung auf cDNA-Ebene: Methode zur Normalisierung von quantitativen Realtime RT-PCR-Daten auf Ebene der cDNA?	132
5	Zusammenfassung.....	135
6	Ausblick.....	137
7	Anhang	138
7.1	Anhang 1: Aminosäurealignment der orthologen Myoglobine von Tieren verschiedener Vertebratengruppen, inklusive diverser Meeressäuger.....	138

7.2	Anhang 2: Sequenzalignment der kodierenden Bereiche des Neuroglobin-Gens	139
7.3	Anhang 3: Sequenzalignment der kodierenden Bereiche des Cytoglobin-Gene aus ausgewählten Mammaliern	141
7.4	Anhang 4: Sequenzalignment der kodierenden Bereiche des Myoglobin-Gens ausgewählter Mammalier	143
7.5	Anhang 5: Vektorkarte des Klonierungsvektors pGEM [®] -T Easy (Promega) aus „Technical Manual: pGEM [®] -T and pGEM [®] -T Easy Vector Systems“ ...	144
8	Literatur	145
9	Danksagung.....	166
10	Lebenslauf	167
11	Veröffentlichungen.....	170
12	Erklärung.....	175

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Pathophysiologie der akuten Höhenkrankheit und Höhenhirnödem	9
Abbildung 1-2: <i>S. golani</i> (2n=54)	11
Abbildung 1-3: Geografische Verbreitung von <i>Spalax</i> in Israel	12
Abbildung 1-4: <i>Spalax</i> -Bruthügel	15
Abbildung 1-5: Aminosäuresequenzalignment von Hb, Mb, Ngb und Cygb	22
Abbildung 1-6: Eigenschaften der vier Globintypen	23
Abbildung 1-7: Penta- und Hexakoordinierung bei Globinen	24
Abbildung 2-1: Realtime-PCR: Prinzip des fluorogenen TaqMan-Assays	43
Abbildung 2-2: Realtime-PCR: Prinzip des SYBR-Green-Assays	44
Abbildung 2-3: Amplifikationsplot einer Verdünnungsreihe von Plasmiden	45
Abbildung 2-4: Beispielhafte Standardgerade	46
Abbildung 2-5: Pipettierschema zur quantitativen Realtime-RT-PCR	51
Abbildung 2-6: Verwendeter Prestained-Marker	54
Abbildung 2-7: Behandlung von Ferkeln bei DHCA	58
Abbildung 3-1: Percent Identity Plot der orthologen Neuroglobingene aus Säugern	67
Abbildung 3-2: Neuroglobin-Immunfluoreszenz im Spalaxgehirn	69
Abbildung 3-3: Ngb-Immunfärbungen in Neuronen des Spalaxgehirns	70
Abbildung 3-4: Ngb-Immunfärbungen in Gliazellen des Spalaxgehirns	70
Abbildung 3-5: Ngb mRNA-Expression unter Normoxie/Hypoxie bei Ratte und <i>Spalax</i>	72
Abbildung 3-6: Ngb-Western Blot: Interspeziesvergleich zwischen Ratte und <i>Spalax</i>	73
Abbildung 3-7: Ngb-Western Blot: Hypoxie	74
Abbildung 3-8: Gelfoto: Generacer Cygb 3' nested PCR	75
Abbildung 3-9: Gelfoto: Cygb Intron 1	76
Abbildung 3-10: Percent Identity Plot der orthologen Cytoglobingene aus Säugern	78
Abbildung 3-11: Ausgewählte Abschnitte des Cygb-Sequenzvergleichs	79-80
Abbildung 3-12: Cygb-Immunfärbungen im Gehirn von <i>Spalax</i>	81
Abbildung 3-13: Cygb-Immunfärbungen in verschiedenen Geweben von <i>Spalax</i>	82
Abbildung 3-14: Cygb mRNA-Expression unter Normoxie/Hypoxie in Ratte und <i>Spalax</i>	85-86
Abbildung 3-15: Cygb-Western Blot: Interspeziesvergleich zwischen Ratte und <i>Spalax</i>	87
Abbildung 3-16: Gelfoto: Isolierung des <i>Spalax</i> -Myoglobingens (CDS und 3' Bereich)	88
Abbildung 3-17: Gelfoto: Isolierung des <i>Spalax</i> -Myoglobingens (5' Bereich)	89
Abbildung 3-18: Sequenz der <i>Spalax</i> Myoglobin-cDNA	89

Abbildung 3-19: Mb mRNA-Expression unter Normoxie/Hypoxie im Skelettmuskel	90
Abbildung 3-20: Mb mRNA-Expression unter Normoxie/Hypoxie im Herzmuskel	91
Abbildung 3-21: Ngb Proteinexpression im Auge von <i>Spalax</i>	93
Abbildung 3-22: Cytochrom c Proteinexpression im Auge von <i>Spalax</i>	94
Abbildung 3-23: mRNA-Expression des Neuroglobingens im Auge von <i>Spalax</i>	95
Abbildung 3-24: Vaskularisierung der <i>Spalax</i> -Retina	96
Abbildung 3-25: Cygb Proteinexpression im Auge von <i>Spalax</i>	97
Abbildung 3-26: nNOS Proteinexpression im Auge von <i>Spalax</i>	98
Abbildung 3-27: mRNA-Expression des Cytoglobingens im Auge von <i>Spalax</i>	99
Abbildung 3-28: Ngb mRNA-Expression nach DHCA und Reperfusion in Ferkeln	101
Abbildung 3-29: Cygb mRNA-Expression nach DHCA und Reperfusion in Ferkeln	102
Abbildung 3-30: PicoGreen Quantifizierung von cDNAs	104
Abbildung 4-1: Synapomorphe 30 Bp-Deletion im Intron 3 des Neuroglobingens	108
Abbildung 4-2: Aminosäuresequenzvergleich der Neuroglobine	109
Abbildung 4-3: Hypoxia Responsive Elements im Neuroglobingen	112
Abbildung 4-4: HRE im Promotor des <i>Spalax</i> Neuroglobingens	113
Abbildung 4-5: Aminosäuresequenzvergleich der Cytoglobine	123
Abbildung 4-6: Hypoxia Responsive Elements im Cytoglobingen	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Barometrischer Druck und Sauerstoff-Partialdruck in verschiedenen Höhen	8
Tabelle 2-1: Rezept zum Gießen eines Polyacrylamidgels	53
Tabelle 2-2: Eingesetzte Erstantikörper für Immunhistochemie	55
Tabelle 3-1: Ergebnisse der Quantifizierung von cDNAs mit PicoGreen	105
Tabelle 4-1: Transkriptionsfaktorbindestellen	111

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
AEC	3-amino-9-Etyhlcarbazol
AMS	Akute Höhenkrankheit (<i>Acute Mountain Sickness</i>)
ÄNS	äußere nukleäre Schicht
ÄPS	äußere plexiforme Schicht
Arnt/ARNT	Aryl-hydrocarbonreceptor-nuclear transporter
ATP	Adenosin-tri-Phosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaar(e)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CDS	Kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
Cygb/CYGB	Cytoglobin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHCA	Deep Hypothermic Circulatory Arrest (Herz-/Kreislaufstillstand bei tiefer Hypothermie)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
Epo/EPO	Erythropoietin
FMN	Flavo-Mononukleotid
G	Gefäße
Gapdh/GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GZS	Ganglienzellschicht
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HACE	Höhenhirnödem (<i>High Altitude Cerebral Edema</i>)
HAPE	Höhenlungenödem (<i>High Altitude Pulmonary Edema</i>)
Hb/HB	Hämoglobin
Hif-1/HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (<i>Hypoxia Inducible Factor-1</i>)
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
Hur	RNA bindendes Protein <i>embryonic lethal, abnormal version, Drosophila homolog 1</i>
IA	Inneres des Auges

INS	innere nukleäre Schicht
IPS	innere plexiforme Schicht
LINE	Long Interspersed Nuclear Element
Lsg.	Lösung
Mb/MB	Myoglobin
min	Minute(n)
MIR	Mammalian-wide Interspersed Repeat
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Ngb/NGB	Neuroglobin
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	NO-Dioxygenase
NSS	Normales Schweineserum
Nt	Nukleotide
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PNS	peripheres Nervensystem
PS	Photorezeptorschicht
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur / reverse Transkription
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
s	Sekunde(n)
SINE	Short Interspersed Nuclear Element
Stap/STAP	<i>Stellate cell activation associated protein</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U.	unit
ü. N.	über Nacht (d. h. mindestens 12 h)
UTR	untranslatierter Bereich
v. a.	vor allem
VE-H ₂ O	voll entsalztes Wasser
Vegf/VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vol.	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Hypoxieanpassungen in Säugetieren

Sauerstoff (O_2) ist ein zentrales Molekül für die oxidative Energiegewinnung und daher lebenswichtig. Tiere benötigen O_2 hauptsächlich dazu, um die ATP-Produktion in der Atmungskette der Mitochondrien zu ermöglichen. Die Stabilität der Biosphäre beruht auf einer empfindlichen Balance zwischen Sauerstoffproduktion der Pflanzen und Verbrauch durch Organismen vom Bakterium zum Menschen, ein Zyklus, der durch die Sonnenenergie aufrechterhalten wird. Die Entstehung der Photosynthese ermöglichte die Zunahme von Sauerstoff in der Atmosphäre (Graham et al. 1995). Die fast ubiquitäre Verfügbarkeit von O_2 führte bei der Entstehung der Eukaryoten dazu, dass diese von Sauerstoff abhängig wurden. Die Verfügbarkeit von Sauerstoff ist nicht in allen Lebensräumen gleich, weshalb verschiedene Arten unterschiedlich gut an niedrige O_2 -Konzentrationen angepasst sind. Viele Tierarten sind im Vergleich zum Menschen besser an niedrige Sauerstoffkonzentrationen angepasst (Hopkins und Powell 2001), v. a. Tiere, deren Lebensraum in großen Tiefen von Seen oder Meeren, großen Höhen oder auch Höhlen liegt.

Sauerstoffmangel kann sowohl durch äußere als auch innere Ursachen hervorgerufen werden. Man unterscheidet Hypoxie und Ischämie. Beide können wichtige Krankheitsbilder des Menschen auslösen oder auch bestehende Krankheiten verschärfen. Als **Hypoxie** bezeichnet man allgemein das Auftreten von Sauerstoffmangel im Blut oder in Geweben, was verschiedene Ursachen haben kann. Dazu zählt zum einen eine verminderte Aufnahme von O_2 über die Lungen oder Kiemen, wie es z. B. in Höhlen, großen Höhen oder großen Tiefen vorkommen kann. Ursache dafür ist, dass nicht genügend Sauerstoff in der Umgebung vorhanden ist, wodurch die Aufnahme in den Körper erschwert wird. Hypoxie kann aber auch auftreten, wenn genügend O_2 in der Umgebung vorhanden ist, dieser aufgrund von Sauerstofftransportstörungen im Blut jedoch nicht aufgenommen werden kann, wie es bei schwerer Anämie der Fall ist (anämische Hypoxie) (Beris 1998). Der Verschluss von Arterien, wie z. B. bei Embolie der Arteriosklerose (Gewebehypoxie), führt ebenfalls zu Hypoxie. Blutleere oder Minderdurchblutung eines Gewebes aufgrund unzureichender Durchblutung bezeichnet man hingegen als **Ischämie**. Diese hat oftmals andere Auswirkungen als globale Hypoxien, da es lediglich zur fokalen Unterversorgung mit Sauerstoff kommt.

EINLEITUNG

Hypoxische Zustände können chronisch oder akut vorkommen. **Chronische Hypoxien**, die z. B. bei Tieren auftreten, die in engen Gangsystemen mit schlecht durchlüfteten Böden leben (vgl. *Spalax*, 1.3.5.4), werden oftmals kompensiert. Dazu gehören Mechanismen, wie z. B. verstärkte Blutbildung, Blutgefäßwachstum oder auch biochemische Veränderungen in Erythrozyten. Für das Blutgefäßwachstum unter (ständiger) Hypoxie ist z. B. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (Vegf) maßgeblich verantwortlich (Shweiki et al. 1992). Vegf sorgt dafür, dass es auf mittelfristige Sicht zur Bildung neuer Blutgefäße kommt, wodurch die O₂-Versorgung verbessert wird. Im Blut von Bergsteigern hat man z. B. die VEGF-Konzentration in geringer Höhe von 490 m untersucht und mit der Konzentration 24 h nach Ankunft bei 4559 m verglichen. Man hat einen 2-3 fach erhöhten Wert gemessen (Walter et al. 2001). Durch ihr schnelles Zellwachstum weisen auch Tumore chronische Hypoxie auf. Das fatale daran ist, dass gerade durch die Hypoxie der Tumor selbst in der Lage ist, die Verfügbarkeit von Nährstoffen sowie Sauerstoff zu erhöhen. Im betroffenen Gewebe sorgt die erhöhte Expression des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1 auch hier für die verstärkte Expression von VEGF und seines Rezeptors. VEGF leitet in tumorösem Gewebe Gefäßneubildung ein. Auch die induzierbare NO-Synthase wird durch HIF-1 Expression im Gewebe angeschaltet. Sie sorgt für Vasodilatation also für Gefäßerweiterung, wodurch ebenfalls die Sauerstoffverfügbarkeit erhöht wird. Somit wird die Versorgung des Tumors durch ihn selbst erhöht, was zu weiterem Wachstum des Tumors führt (Vaupel und Harrison 2004). Dieses Schema ist in vielen Krebsarten sehr ähnlich, beschrieben z. B. für Prostatakrebs (Cvetkovic et al. 2001), Brustkrebs (Vaupel et al. 2002), Gebärmutterhalskrebs (Cheng et al. 2000) und Darmkrebs (Guba et al. 2004), um nur einige zu nennen. Dies wird gewährleistet durch den ebenso unter systemischer Hypoxie, wie in hypoxischen Tumoren verstärkt exprimierten Hypoxie-responsiven Faktor HIF-1 (vgl. 1.3.5.6; Maxwell et al. 2001). Das führt dazu, dass durch Vegf Tumore besser mit O₂ versorgt werden, wodurch das Tumorwachstum noch beschleunigt wird. An dieser Stelle setzen Antiangiogenese-Strategien in der Tumorbekämpfung erfolgreich an (Diaz-Rubio 2006; Schneider und Sledge 2007). Auch Erythropoietin (EPO) gehört zu den Proteinen, die durch Bindung des Transkriptionsfaktors HIF-1 unter hypoxischen Bedingungen stark exprimiert werden. EPO ist verantwortlich für die Bildung von Erythrozyten und wird aus diesem Grund in der Medizin schon erfolgreich bei Anämie eingesetzt (Beris 1998). Auch im Sport-Doping findet EPO Verwendung, da es die O₂-Verfügbarkeit im Blut erhöht.

Akute Hypoxie tritt z. B. bei Herzinfarkt, Schlaganfall, Lungenembolie, Schock oder Ertrinken auf und führt zu Atemnot mit Angstzuständen, Verwirrtheit und Blutdruckanstieg.

EINLEITUNG

Bei längerem Bestehen der O₂-Unterversorgung kommt es ohne Ursachenbekämpfung zu Herzverlangsamung, Blutdruckabfall, Kreislaufstillstand und Zyanose („Blauwerden“ durch O₂-Armut). In den verschiedenen Organen treten nach unterschiedlich langer Zeit des O₂-Mangels bleibende Schäden auf, wobei die Überlebenschance des Organismus primär von der extrem kurzen Hypoxie-Überdauerung des Gehirns (nur 3–5 Minuten) abhängt. Schädigungen des Gehirns durch kurzzeitige Hypoxie treten auch während der Geburt (Perlman 1997; Grow und Barks 2002), sowie bei Säuglingen auf, die schon kurz nach ihrer Geburt aufgrund angeborener Herzfehler operiert werden müssen (Abdul-Khaliq et al. 2001). Um die Toleranz des Körpers gegenüber einer zeitweise geringen O₂ Versorgung zu erhöhen, werden Operationen am offenen Herzen von Kindern bei tiefer Körpertemperatur (Hypothermie) durchgeführt (vgl. 4.4). Hierdurch stellt sich ein niedriger Metabolismus ein und es kommt in hypoxiesensitiven Organen wie z. B. dem Gehirn zu geringeren Schädigungen (Abdul-Khaliq et al. 2001). Eine Hyperthermie hingegen verringert die Toleranz gegenüber Hypoxie, besonders von bösartigen Tumoren und wird deshalb erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt (Wust et al. 2002; Issels 2006).

Besonders anfällig gegenüber Sauerstoffmangel sind neuronale Zellen. Sie zählen zu den am stärksten Anoxie-sensitiven Zellen überhaupt (Anoxie = komplettes Fehlen von Sauerstoff), wengleich Studien gezeigt haben, dass es Mechanismen in diesen Zellen gibt, sich vor Hypoxie zu schützen (Hochachka und Lutz 2001; Bickler und Donohoe 2002). Neurone sind z. B. in der Lage, sich durch Präkonditionierung an Stressoren zu „gewöhnen“, die sonst extrem schädlich wären, wie die Toleranz gegenüber Hypoxie (Ferriero 2005). Auf molekularer Ebene passiert dabei eine verstärkte Expression von HIF-1 (Jones und Bergeron 2001), welcher auch für das Anschalten von Genen verantwortlich ist, die an Reparaturmechanismen beteiligt sind (Wang und Semenza 1993; Mu et al. 2003). Jedoch gibt es in einigen Tiergruppen auch hypoxieresistente Neurone. Dazu gehören die Zellen einiger, aber nicht aller Schildkröten (u. a. Gattung *Chrysemys*), die bei 1-3 °C während des Winterschlafes Anoxie bis zu mehrere Monate überleben (Lutz 1992; Storey 2007). Diese Zellen ertragen Anoxie durch die Reduktion aller Aktivitäten, und außerdem müssen fast alle Neurone für lange Zeit funktionell „ausgeschaltet“ werden (Bickler und Donohoe 2002).

Mittlerweile weiß man, dass eine Schädigung des Gehirns nach Schlaganfall oder anderen ischämischen Ereignissen nicht ausschließlich auf dem Sauerstoffentzug beruht, sondern vielmehr auf dem plötzlichen Durchströmen des Körpers mit Sauerstoff („Reperfusion“). Dabei entstehen in und um das hypoxische Gewebe herum reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*, wie z. B. Sauerstoffradikale) oder reaktive Stickstoffspezies (RNS,

reactive nitrogen species), die das betroffene Gewebe auf vielfältige biochemische Weise schädigen (Hensley et al. 2000; Moro et al. 2004; Moro et al. 2005).

1.2 Hypoxiesensitive Tiermodelle

Nicht alle Organismen sind gut an das Leben unter begrenzter Sauerstoffverfügbarkeit angepasst. Die Vielzahl der an Land lebenden Arten unterschiedlichster Tiergruppen kommt Zeit ihres Lebens nicht mit Sauerstoffmangel in Berührung, weshalb die Adaptationen vieler Tiere an diese Umweltbedingungen nur in geringem Ausmaß gegeben sind. Zu diesen hypoxiesensitiven Säugern gehören der Mensch sowie die häufig eingesetzten Modellorganismen Maus (*Mus musculus*) und Ratte (*Rattus norvegicus*). Jede Tierart toleriert ohne Gewöhnung eine beschränkte minimale Sauerstoffkonzentration, jedoch hat jeder Organismus begrenzte Möglichkeiten, eine individuelle Hypoxietoleranz zu entwickeln. Ein Beispiel dafür sind Bergsteiger, die sich beim Erklimmen der höchsten Gipfel der Erde schrittweise an die dort herrschenden niedrigen Sauerstoffbedingungen gewöhnen (vgl. 1.3.4). Je langsamer der Anstieg, desto besser die Akklimatisierung und desto niedriger die Gefahr von lebensbedrohlichen Sauerstoffkonzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die wenig hypoxieresistente Ratte als Vergleichsobjekt zu den hypoxietoleranten Nagern der Gattung *Spalax* (vgl. 1.3.5) verwendet, um einen Vergleich der physiologischen Anpassung auf Gen- und Proteinexpressionsebene anzustellen.

1.2.1 Das Hausschwein als hypoxiesensitiver Organismus und als Operationsmodell

Ein weiterer untersuchter hypoxiesensitiver Organismus, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist das Hausschwein (*Sus scrofa*). Junge Ferkel dienen als Modell für angeborene Herzkrankheiten bei Kindern (Abdul-Khaliq et al. 2001). Diese Herzfehler sind in der Regel so schwerwiegend, dass die Kinder schon im Säuglingsalter operiert werden müssen. Etwa 0,8 % aller Kinder kommen mit einem angeborenen Herzfehler zur Welt, wovon ein Drittel dieser Herzfehler im ersten Lebensjahr operativ korrigiert werden muss. Diese Herzoperationen gehen einher mit einem induzierten Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (DHCA: *deep hypothermic circulatory arrest*), was in der späteren Entwicklung des Kindes oftmals zu schweren psychomotorischen und mentalen Entwicklungsstörungen führen kann (Jonas und Volpe 1996). Um Herzoperationen durchführen zu können, wird das

EINLEITUNG

Blut nach Anästhesie mit Hilfe einer extrakorporalen Zirkulation (EKZ) um das Herz herumgeleitet. Dadurch wird das gesamte Tier heruntergekühlt und ein Herzstillstand induziert. Bei Operationen am offenen Herzen ist es notwendig, auch die EKZ für die Dauer der Operation abzuschalten, wodurch es zu globalen und fokalen hypoxischen bzw. ischämischen Ereignissen u. a. im Gehirn kommt, was zu den angesprochenen Entwicklungsstörungen führt. Sowohl in Kaninchen als auch in neugeborenen Schweinen konnte gezeigt werden, dass ein 60-minütiger Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie noch zu keiner signifikanten, histologisch sichtbaren neuronalen Schädigung führt. Nach 120 min DHCA sind immer noch erstaunlich viele intakte Neurone zu finden, jedoch ist die Schädigung deutlich sichtbar (Abdul-Khaliq 2002). Es gibt tierexperimentelle Hinweise darauf, dass eine Behandlung mit Steroidhormonen einen protektiven Effekt bei der Durchführung von zweistündigem DHCA herbeiführt. Dabei gibt es einen Unterschied zwischen der systemischen Gabe von Steroidhormonen und der intrathekalen Injektion in den Duralsack (Rückenmark umhüllende Hirnhaut; zwischen Rückenmark und Duralsack verläuft die Hirnflüssigkeit) der Wirbelsäule. Die systemische Verabreichung zeigt keine Neuroprotektion, wogegen eine intrathekale Applikation die Anzahl hypoxisch-nekrotischer Neurone im Hippocampus signifikant reduziert (Abdul-Khaliq et al. 2000).

1.3 Hypoxietolerante Tiermodelle

Um Hypoxie bzw. Ischämie beim Menschen therapieren zu können, muss man verstehen, wie manche Tierarten erfolgreich O₂-Mangelsituationen überstehen. Es gibt in vielen Tieren mannigfaltige Adaptationen, die zu Hypoxietoleranz des Organismus führen, anders als es z. B. beim Menschen oder den in dieser Arbeit untersuchten Modellorganismen Ratte oder Schwein der Fall ist.

1.3.1 Tauchende Säugetiere und Vögel

Die bekanntesten Beispiele in diesem Zusammenhang sind wohl **tauchende Säuger und Vögel**. Man weiß, dass einige Robben in der Lage sind, bis 1600 m tief zu tauchen und auch Kaiserpinguine (*Aptenodytes forsteri*) 550 m tief tauchen können (Kooyman und Ponganis 1998). Die längsten aufgezeichneten Tauchgänge betragen für Kaiserpinguine 22 min (Robertson G., unveröffentlichte Beobachtungen) und 120 min für den Südlichen Seeelefanten *Mirounga leonina*. Diese Tiere sind in der Lage, zu Beginn ihres Tauchgangs große Sauerstoffvorräte zu speichern. In tief tauchenden Arten sind über 80 % des

EINLEITUNG

gespeicherten Sauerstoffs im Hämoglobin des Blutes und Myoglobin der Muskeln angelegt. Man weiß, dass eine erhöhte Konzentration an Myoglobin im Muskel die gemeinsame Eigenschaft aller tieftauchenden Vögel und Säuger ist (Butler und Jones 1997). Die Tauch-„Kapazität“ steigt proportional zur Myoglobin-Konzentration im Muskel (Kooyman und Ponganis 1998). Mittelhohe Myoglobin-Konzentrationen wurden in Flachwasser-, sowie Kurzeittauchern gefunden, zu denen u. a. Rundschwanzseekühe, Bismarratten, Bibern oder Schwimmenten gehören (MacArthur 1990; Kooyman und Ponganis 1998). Um weniger Energie zu verbrauchen und so den Tauchgang verlängern zu können, wird der Puls gesenkt und gleichzeitig die Metabolismusrate herabgesetzt (Scholander 1940; Hochachka 2000; Ramirez et al. 2007). Dann werden v. a. das ZNS, PNS sowie das Herz mit Sauerstoff versorgt. Die Skelettmuskulatur hat durch ihren Myoglobingehalt hingegen so viel O₂ gespeichert, dass dieses Gewebe nicht über den Blutkreislauf mit Sauerstoff versorgt werden muss. Der Muskelmyoglobingehalt ist folgerichtig um ein vielfaches höher als bei den meisten terrestrischen Säugern (Snyder 1983). Hinzu kommt, dass der Muskel auch auf anaeroben Stoffwechsel wie Laktatgärung umschalten kann. Dies geschieht in der Regel nicht bei Robben, dafür häufig bei tauchenden Vögeln (Kooyman und Ponganis 1998).

1.3.2 Hypoxietolerante Vögel

Neben tieftauchenden Vögeln, die im vorherigen Abschnitt besprochen wurden, gibt es auch Vögel, die aufgrund einer extremen Flughöhe hypoxischen Zuständen ausgesetzt sind. Besonders herauszuheben ist dabei die Streifengans (*Anser indicus*), die bei Höhen von 9.000 bis 11.000 m fliegt. Dabei entstehen möglicherweise Sauerstoffpartialdrücke von 30-35 mm Hg, die beim (unangepassten) Menschen Bewusstlosigkeit und Tod hervorrufen würden. Vögel dieser Art wandern von ihrem Überwinterungsort auf dem indischen Subkontinent zu den Brutstellen im südlichen Zentralasien. Diese Tiere fliegen nonstop vom Meeresniveau über das Himalaya-Gebirge, bevor sie auf 5.500 m ihr Nest aufbauen (Swan 1970). Die ungewöhnlich gute Hypoxietoleranz kommt aufgrund verschiedener Adaptationen zustande. Dazu gehören z. B. eine stärkere Vaskularisierung der Skelettmuskeln (Monge und Leon-Velarde 1991, Faraci 1991) sowie erhöhte Muskelmyoglobingehalte (Reynafarje et al. 1975). Beides führt zu einer effizienteren zellulären Aufnahme von O₂. Eine morphologische Anpassung an den Flug allgemein ist die Verwendung einer effizienten Sauerstoffaufnahme in der parabronchialen Lunge durch das Kreuzstromprinzip, das nur bei Vögeln verwirklicht ist. Dabei strömt die Luft sowohl beim Ein- als auch beim Ausatmen im rechten Winkel an

den Kapillaren vorbei. Beides kombiniert führt dazu, dass der Gasaustausch bei Vögeln effizienter ist als bei der alveolaren Lunge der Säugetiere (Piiper und Scheid 1975; Ramirez et al. 2006).

1.3.3 Schildkröten

Einige Süßwasser-Schildkrötengattungen (*Trachemys* und *Chrysemys*) sowie die marine Art *Caretta caretta* sind ein Beispiel für großartige Hypoxietoleranz in Reptilien. Sie können sogar kompletten Sauerstoffentzug (Anoxie) überleben. Bei anoxiesensitiven Spezies kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einer Stagnation der ATP-Produktion gefolgt von einem ernsten Mangel an ATP, innerhalb von ein bis zwei Minuten (Siesjö 1978). Als Konsequenz fällt die ATP-abhängige Na^+/K^+ -Pumpe aus, was zum Verlust des Membranpotenzials und zur Depolarisation führt. Depolarisation erlaubt es, dass Calcium-Ionen in die Neuronen einströmen, die in starker Konzentration zur Dysfunktion multipler zellulärer Prozesse führt. Ein wichtiger Bestandteil der Reaktion von Hypoxie- oder Anoxie-resistenter Spezies auf Mangel an Sauerstoff ist die Eigenschaft, dass es durch ATP-Mangel nicht zu einem unmittelbaren Abfall des Membranpotenzials kommt. Das geschieht u. a. dadurch, dass der ATP-Level bei Anoxie im Schildkrötengehirn für mindestens drei bis fünf Stunden Anoxie aufrechterhalten wird (Lutz et al. 1985; Kelly und Storey 1988; Perez-Pinzon et al. 1992). Auch Goldfische und Karpfenfische zeigen dieses Phänomen (Van der Boon et al. 1992). Aktionspotenziale können in cortikalen Pyramidenzellen noch nach drei Stunden dauernder Anoxie ausgelöst werden (Doll et al. 1991), in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns bei Schildkröten noch nach einer Stunde (Perez-Pinzon et al. 1992). Die Aktivität des Säugergehirns hingegen ist schon nach wenigen Sekunden Anoxie völlig unterdrückt. Der Schlüssel zum Erfolg der anoxie- oder hypoxietoleranten Spezies liegt in zwei wichtigen Eigenschaften. Zum einen ist es das Herunterfahren des Metabolismus (Hypometabolismus) sowohl des Gehirns als auch des ganzen Körpers (Lutz et al. 1996; Storey 1996). Zu allererst gehört dazu die Fähigkeit zu erkennen, dass es Sauerstoffmangel gibt (Hochachka und Lutz 2001), wodurch Energiesparmaßnahmen eingeleitet werden können. Ein wichtiger Bestandteil der akuten Hypoxieantwort ist, die lokomotorische Aktivität auf nur noch die Hälfte zu verringern, was zur Einsparung von 35-40 % an Energie führt (Nilsson et al. 1993). Das zweite Standbein der Anoxie- bzw. Hypoxietoleranz ist eine verstärkte glykolytische ATP-Produktion, gerade auch während der ersten Phasen der Anoxie (Lutz et al. 1996).

EINLEITUNG

Eine weitere Anpassung auf Ebene des Sauerstoff-Transportes gibt es im Blut der carnivoren grünen Meeresschildkröte (*Chelonia mydas*), die auf der Suche nach Beute mehrere Tauchgänge unmittelbar aneinander anschließt. Diese Schildkröte hat eine höhere Sauerstoffaffinität des Hämoglobins als die eher an der Oberfläche im Flachwasser lebende, sich vorwiegend herbivor ernährende Unechte Karettschildkröte (*Caretta caretta*).

1.3.4 Höhenlebende Menschen

Auch große Höhen können zu Sauerstoffmangel im Gewebe führen. Zwar fällt der relative Anteil an Sauerstoff von 21 % nicht ab, jedoch verringert sich der barometrische Druck, wodurch absolut weniger Sauerstoff zur Verfügung steht. Dadurch steht z. B. in einer Höhe von 6.000 m nur noch ca. 50 % des auf Meeresniveau eingeatmeten Sauerstoffs zur Verfügung. Auf der Spitze des Mount Everests bei 8.848 m sogar noch weniger als ein Drittel des Sauerstoffpartialdrucks auf Meeresniveau (Hochachka und Rupert 2003; West 2004 vgl. Tabelle 1-1). Man nennt diese Art von Sauerstoffmangel hypobarische Hypoxie.

Tabelle 1-1: Barometrischer Druck und eingeatmeter Sauerstoff-Partialdruck in verschiedenen Höhen über dem Meeresspiegel (Tabelle aus West 2004).

Höhe [m]	Barometrischer Druck [mm Hg]	Eingeatmeter Sauerstoff-Partialdruck [mm Hg] (% des Meeresniveaus)
0	760	149 (100)
1000	679	132 (89)
2000	604	117 (79)
3000	537	103 (69)
4000	475	90 (60)
5000	420	78 (52)
8848 (Mount Everest - Gipfel)	253	43 (29)

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Beispielen für extreme Hypoxietoleranz steht der Mensch, der nur eine sehr schlechte Anpassung an Lebensräume zeigt, in denen Sauerstoffmangel herrscht. Diese großen Höhen bedürfen einer langsamen, schrittweisen Akklimatisierung des Körpers, da das Sauerstofftransportsystem des Menschen in der Regel an Lebensräume auf Meeresniveau angepasst ist (Hochachka und Rupert 2003). Physiologische Antworten auf dieses Problem beinhalten erhöhte Herz- und Atemfrequenz sowie hämatologische Veränderungen. Es gibt verschiedene Ausprägungen dieser so genannten Höhenkrankheit. Man grenzt u. a. akute Höhenkrankheit AMS (*Acute Mountain*

EINLEITUNG

Sickness), Höhenlungenödem HAPE (*High Altitude Pulmonary Edema*) und Höhenhirnödem HACE (*High Altitude Cerebral Edema*) voneinander ab. Die akute Höhenkrankheit tritt z. B. bei 50 % der Wanderer auf, die in Nepal für fünf oder mehr Tage auf über 5.000 m Höhe steigen (Hackett und Rennie 1976, 1979) oder bei 84 % der Flugpassagiere, die unmittelbar, ohne Eingewöhnung an große Höhen, in mehr als 3860 m landen (Murdoch 1995). AMS-Symptome sind Kopfweg, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Übereben, Ermüdungserscheinungen, Schwindelanfälle und Schlafstörungen. Sie tauchen in der Regel sechs bis zwölf Stunden nach Erreichen der Höhe auf. Das Krankheitsbild des Höhenlungenödems ist als Endstufe der AMS bekannt und ist gekennzeichnet durch Bewusstseinsstörungen sowie Gleichgewichts- und Koordinationsstörungen. Außerdem treten als Folge dessen Koma und Tod auf (Basnyat und Murdoch 2003). In Abbildung 1-1 ist ein möglicher Ablauf der Pathophysiologie von AMS und HACE dargestellt.

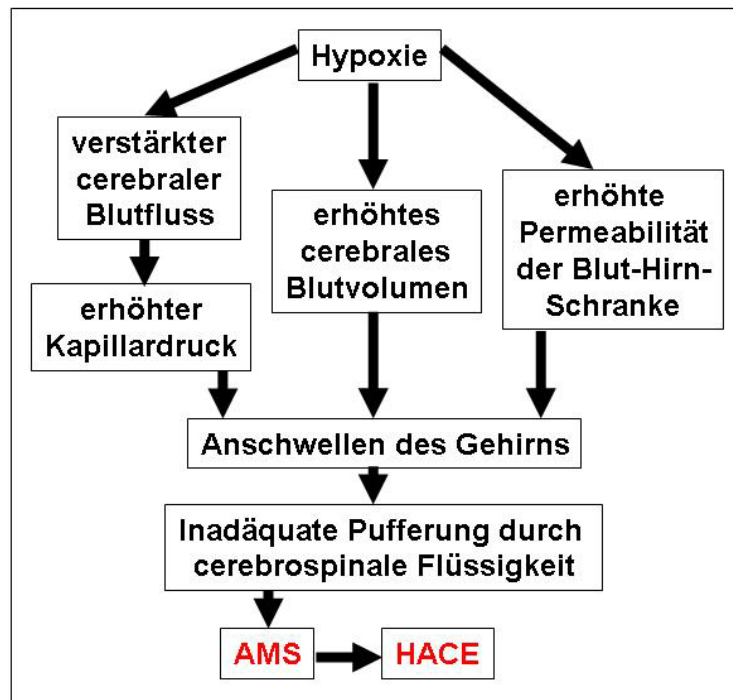


Abbildung 1-1: Vorgeschlagene Pathophysiologie der akuten Höhenkrankheit (AMS) sowie der Höhenhirnödem (HACE; verändert nach Basnyat und Murdoch 2003).

Höhenlungenödeme (HAPE) treten in der Regel in den ersten zwei bis vier Tagen nach Ankunft in Höhen von über 2.500 m auf und entstehen nicht zwangsweise als Folge von AMS (Basnyat und Murdoch 2003). Besonders gefährdet für das Auftreten von HAPE sind verstärkt Männer, die unter Störungen des Herz-Lungen-Kreislaufs leiden, verbunden mit erhöhtem pulmonalem Blutdruck. Ein Symptom von HAPE ist Atemnot bei Anstrengung, die schneller eintritt, als für diese Höhe erwartet. Zuerst kommt es zu trockenem Husten, gefolgt

EINLEITUNG

von bluthaltigem Auswurf. HAPE führt außerdem zu ähnlichen Symptomen wie HACE und kann ebenso tödlich enden. Das Vorkommen von HAPE (und auch HACE) ist mit 0,1 bis 4 % sehr viel geringer als von AMS (Basnyat und Murdoch 2003).

Nur eine langwierige Anpassung an große Höhen sorgt im schlecht an Hypoxie angepassten Menschen für eine leichte Verbesserung der Hypoxietoleranz und ist unumgänglich für Bergsteigertouren im Himalaya-Gebirge oder den Anden. Eine Faustregel besagt, dass man ab 3.000 m Höhe täglich nicht mehr als durchschnittlich 300 m an Höhe überwinden sollte, um den Körper langsam an den Sauerstoffmangel zu gewöhnen (EverestNews.com vom 13.04.2006). Sherpas, einheimische Himalayabewohner, die Zeit ihres Lebens auf über 4.000 m leben, wurden nach Bergtouren auf über 8.000 m auf Veränderungen des Gehirns hin untersucht und mit Bergsteigern verglichen, die im Flachland leben und ebenfalls 8.000 m Höhe überschritten haben (Garrido et al. 1996). Dabei wurden bei 13 von 21 (61 %) Bergsteigern, die im Flachland leben, psychoneurologische Symptome festgestellt. Bei 100 % der Bergsteiger waren Unregelmäßigkeiten bei Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) des Gehirns zu verzeichnen. Das sind Anzeichen milder kortikaler Atrophie und / oder periventrikulärer Störungen in der weißen Substanz des Gehirns. Bei den Sherpas hingegen gab es nur bei einem von sieben (14 %) ähnliche MRT-Ergebnisse und neurologische Symptome. Ein „Training“ ungeübter Personen im Gebirge sorgt für einen erhöhten Muskelmyoglobingehalt und wird von Sportlern als „legales Dopingmittel“ eingesetzt, um ihre Leistungsfähigkeit zu steigern.

1.3.5 *Spalax ehrenbergi*: ein Säuger-Tiermodell für Hypoxietoleranz

1.3.5.1 Taxonomie, Systematik und Diversität

Blindmäuse der Familie Spalacidae (Blindmäuse oder Stumpfschnauzenmulle) sind ratten- bis kaninchengroße Nagetiere (Rodentia). Wie die Muridae gehören sie zur Unterordnung Myomorpha (Mäuseverwandte). Die Gattung *Spalax* unterscheidet die folgenden drei verschiedenen Superspezies:

- *Spalax leucodon* (*Nannospalax leucodon*) – Westblindmaus, Nordmann, 1840;
- *Spalax microphthalmus* – Ostblindmaus;
- *Spalax ehrenbergi* – Ehrenberg-Blindmaus (Nevo et al. 2001).

EINLEITUNG

1.3.5.2 Geografische Verbreitung

Die Verbreitung von *Spalax* erstreckt sich von der östlichen Seite des Mittelmeeres und des schwarzen Meeres, vom Balkan durch die Ukraine, Kleinasien, Syrien, Palästina, Israel bis hin nach Ägypten und Libyen (Carleton and Musser, 1984; Nowak, 1999).

Die Superspezies *Spalax ehrenbergi* besteht in Israel aus vier morphologisch sehr ähnlichen, jedoch chromosomal differenzierten und geografisch isolierten Schwesterarten (Nevo et al. 2001). Darunter versteht man eine monophyletische Gruppe von Arten, die kreuzbar aber infertil sind. Die vier Zytotypen (*Spalax galili* ($2n=52$), *Spalax golani* ($2n=54$) (Abbildung 1-2), *Spalax carmeli* ($2n=58$) und *Spalax judaei* ($2n=60$)) unterscheiden sich in ihrer geografischen Verbreitung in Israel und den angrenzenden Ländern Jordanien, Libanon und Syrien (Abbildung 1-3). Ihr Vorkommen ist korreliert mit einer zunehmenden Aridität sowie Temperatur südwärts ($2n=52 \rightarrow 58 \rightarrow 60$) und ostwärts ($2n=52 \rightarrow 54$). Man kann die Spezies daher etwa folgenden klimatischen Bedingungen zuordnen:

- *S. galili* ($2n=52$): kühl-humid,
- *S. golani* ($2n=54$): kühl-semi-arid,
- *S. carmeli* ($2n=58$): warm-humid,
- *S. judaei* ($2n=60$): warm-arid.

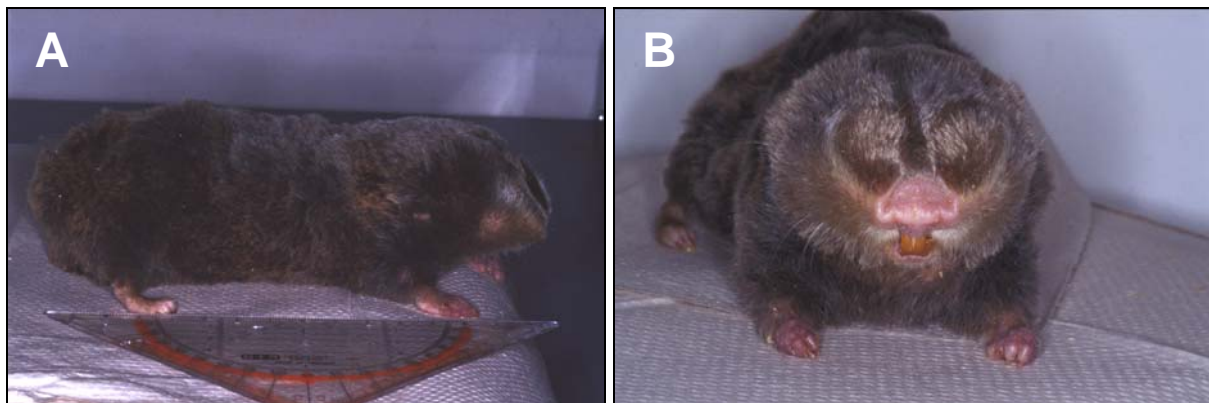


Abbildung 1-2: Bild von *S. golani* ($2n=54$). (A) Seiten- (B) Frontansicht

Abgesehen von dem Fluss Jordan, der *S. galili* ($2n=52$) und *S. golani* ($2n=54$) voneinander trennt, und dem Fluss Yarkon, der *S. carmeli* ($2n=58$) und *S. judaei* ($2n=60$) teilweise separiert, gibt es keine natürlichen Barrieren zwischen den Arten. In den Grenzgebieten der einzelnen Verbreitungsregionen kommt es immer wieder zu Hybridbildungen, die jedoch steril sind.

EINLEITUNG

Besonders im Norden Israels gibt es flutgefährdete Gebiete und Regionen mit sehr dichtem Boden. Dies ist der Grund dafür, dass *Spalax* zum einen natürlicherweise chronische, milde Langzeithypoxie in schlecht durchlüfteten Gängen überleben muss (Shams et al. 2005). Zum zweiten gefährdet akute, ausgeprägte Kurzzeithypoxie, bedingt durch kurzfristige Überschwemmungen, das Leben der Tiere. Die besonders in Überflutungsgebieten vorkommende Art *S. galili* ($2n=52$) ist mit Sicherheit das hypoxieresistenteste Nagetier überhaupt (persönliches Gespräch mit Prof. Dr. Eviatar Nevo, Institute of Evolution, Haifa, Israel), und neben einigen tieftauchenden Vertretern gehört es sogar zu den hypoxietolerantesten Säugetieren. Die relativ am schlechtesten an Hypoxie adaptierte *Spalax*-Spezies ist *S. judaei* ($2n=60$), die vorwiegend in Wüstengebieten Israels lebt.

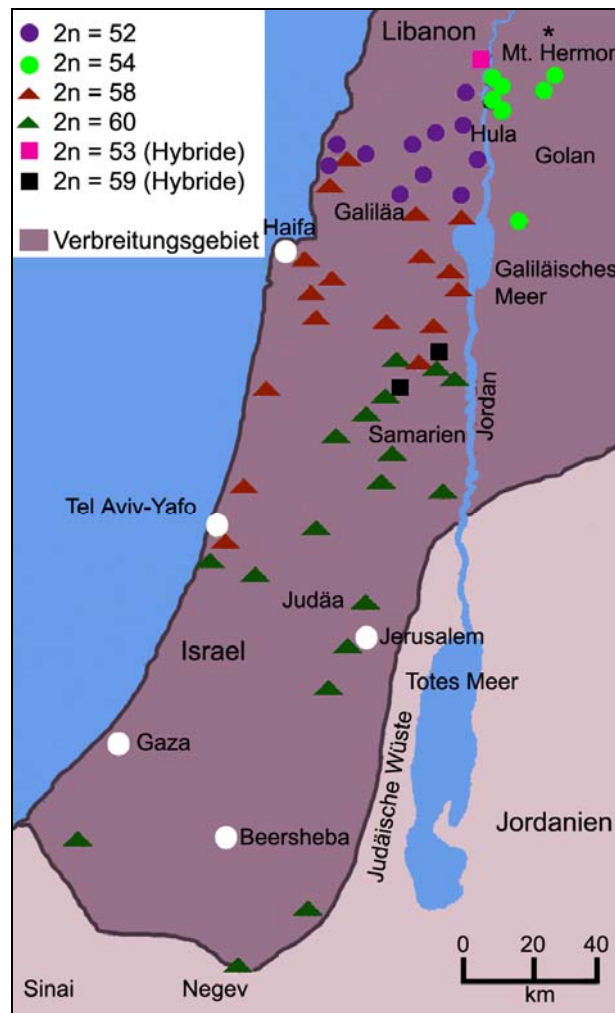


Abbildung 1-3: Geografische Verbreitung der vier in Israel vorkommenden *Spalax ehrenbergi* Subspezies. In Grenzgebieten wurden Hybridbildungen beobachtet. Verändert nach Nevo et al. (2001).

1.3.5.3 Morphologie

Spalax gehört zu den Nagetieren, die aus morphologischer und physiologischer Sicht am besten an das unterirdische Leben angepasst sind. Der Körper von *Spalax* ist in Anpassung an diese Lebensweise walzenförmig mit kurzen Beinen. Die Kopf-Rumpf-Länge beträgt 15-30 cm und kann bei *Spalax microphthalmus* sogar bis zu 51 cm betragen. *Spalax* wiegt zwischen 130 und 300 g (Grzimek 2000) und hat einen breiten, kräftig gebauten Kopf, der entlang der kompletten Vorderseite Tasthaare trägt. Kopf und Hals sind fast körperdick, und ein äußerer Schwanz fehlt. Für ein grabendes Tier hat *Spalax* zierliche Füße, an denen sich jeweils fünf Zehen mit kurzen Krallen befinden. *Spalax* setzt zum Graben vor allem seine vorstehenden Schneidezähne ein, die sehr kräftig ausgebildet sind. Da *Spalax* Zeit seines Lebens fast ausschließlich unterirdisch lebt, haben die Augen durch die starke Reduktion von Linse, Iris und Ziliarkörper die Funktion als Sehorgan fast vollständig verloren. Die Augen sind im Durchmesser 0,6-1 mm groß und besitzen die für Rodentia einmalige Eigenschaft, dass sie komplett von Haut überwachsen sind (Bronchti et al. 2002). Die Netzhaut weist jedoch die gleiche Schichtung auf wie die anderer Mammalier (Cernuda-Cernuda et al. 2002). Diese besitzt ein Zapfenpigment, das zu den am weitesten rot-verschobenen Photopigmenten der Rodentia gehört (David-Gray et al. 1998). Die Reduktion der Augen sowie ihrer Sehfähigkeit selbst geht einher mit einer 87-93 %igen Reduktion derjenigen Gehirnregionen, die mit dem bildformenden visuellen System assoziiert sind (Cooper et al. 1993). *Spalax* ist lediglich noch in der Lage, Licht zu perzipieren und darüber die zirkadiane Rhythmik zu steuern (Avivi et al. 2002). Das Chiasma opticum ist bei *Spalax* ebenfalls vollständig zurückgebildet (eigene Beobachtung).

Bei *Spalax* ist also eine visuelle Kommunikation nicht möglich und nicht nötig, jedoch gibt es eine ausgeprägte seismische Verständigung zwischen Artgenossen. Das Erzeugen niederfrequenter Töne geschieht durch das Schlagen des Kopfes gegen die Höhlenwand. Eine optimale unterirdische Signalweitergabe ist erfolgt bei Frequenzen zwischen 0,1 und 5 kHz (Heth et al. 1986; Heth et al. 1987; Heth et al. 1988; Bronchti et al. 2002). Die Ohrmuschel ist bis auf einen knorpeligen Ansatz des äußeren Gehörganges vollständig reduziert.

Vergleicht man *Spalax* mit den Maulwürfen der Familie Talpidae, zu denen auch der Europäische Maulwurf (*Talpa europaea*) gehört, so fällt auf, dass es drei Gruppen gibt, die sich in ihrem Habitat und damit auch in ihrer Morphologie unterscheiden: In der ersten Gruppe sind die spitzmausähnlichen, endemisch-überirdisch lebenden Maulwürfe. Die zweite Gruppe bilden die teils grabenden und teils überirdisch lebenden Tiere mit leicht verbreiterten Schaufelhänden, um beim Graben die Arbeit leichter verrichten zu können. Die dritte Gruppe,

die wie *Spalax* ausschließlich subterran lebt, besitzt hochspezialisierte Vordergliedmaßen (Shinohara et al. 2004).

1.3.5.4 Habitat und Nahrung

Carleton und Musser 1984 beschreiben, dass *Spalax* Hochland-Steppen, Bergtäler, landwirtschaftliche Felder, Obstfelder, Wälder, Fluss- und Seebecken, Weideland und buschige Gebiete bewohnt (Nevo et al. 2001). Dabei ist es gleich, ob es sich um niedrig gelegene, hügelige oder auch gebirgige Regionen (bis 2.600 m Höhe) handelt. Sie leben in mitteldichten sandigen oder lehmigen Böden. *Spalax ehrenbergi* legt weit verzweigte, bis zu drei Meter tiefe Gangsysteme mit Nest-, Vorrats- und Kotkammern an. Die waagerechte Ausdehnung kann 30 m und mehr betragen. Bei der Ostblindmaus hat man einen 169 m langen Bau mit 14 Hügeln gefunden. Allgemein liegen die Wohn- und Vorratsräume eher in der Tiefe, die Futtergänge nahe an der Erdoberfläche, da diese unmittelbar an den Wurzeln der Futterpflanzen vorbeiführen. Beim Graben mit den mächtigen Schneidezähnen wird die Erde gelockert und von den Vorder- und Hinterfüßen nach hinten befördert. Dabei bilden die Lippen Falten, die hinter den Schneidezähnen den Mund verschließen. Die abgegrabene Erde wird an die Erdoberfläche transportiert und bildet dort die für Blindmäuse typischen großen Erdhügel.

Spalax ernährt sich ausschließlich herbivor. Da sie als Nahrung Wurzeln, Zwiebeln, Knollen sowie Kulturpflanzen bevorzugt, kann *Spalax* zur Plage für die Landwirtschaft werden. Große Mengen pflanzlicher Nahrung werden in den oben beschriebenen unterirdischen Kammern gespeichert (Carleton und Musser 1984; Nowak 1999).

In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass *Spalax* auch selbst für andere Tierarten als Nahrung dient. Zum einen schrieb Kumerloeve (1955), dass bei einer Steinkauzbrut Nahrungsreste gefunden wurden, worunter sich u. a. zwei *Spalax* Tiere (wahrscheinlich *Spalax leucodon*) befanden. Zum anderen wurde im Magen einer etwa 80 cm langen Schlange der Art *Vipera palaestinae*, die von einem Auto überfahren wurde, drei 8-9 cm große *Spalax ehrenbergi* gefunden, die kurz zuvor gefressen wurden (Mienis 1982). Auch Eulen jagen gelegentlich Blindmäuse, wenngleich *Spalax* nur sehr selten an die Erdoberfläche kommt (Carleton und Musser 1984; Nowak 1999; Nevo 1999).

EINLEITUNG

1.3.5.5 Fortpflanzung und Verhalten

Zur Zeit der Fortpflanzung baut *Spalax* eine besondere Art von Hügel, den Bruthügel (Abbildung 1-4; Carleton und Musser 1984; Nevo 2001). Dieser wird von einem Weibchen im Herbst nach dem ersten Regen angelegt und hat einen Außendurchmesser von über einem Meter und eine Höhe von ca. 40 cm über dem Boden. Im Hügel befindet sich eine im Durchmesser ca. 20 cm große Kammer, die über zahlreiche Gänge mit Vorrats- und Kotkammern verbunden ist. Während der Paarungszeit findet man um diese von Weibchen bewohnten Hügel 15 bis 20 kleinere Erderhebungen mit Kammern, in denen sich Männchen aufhalten. Die Paarung findet in den Bruthügeln statt, wo später auch die Jungen großgezogen werden.

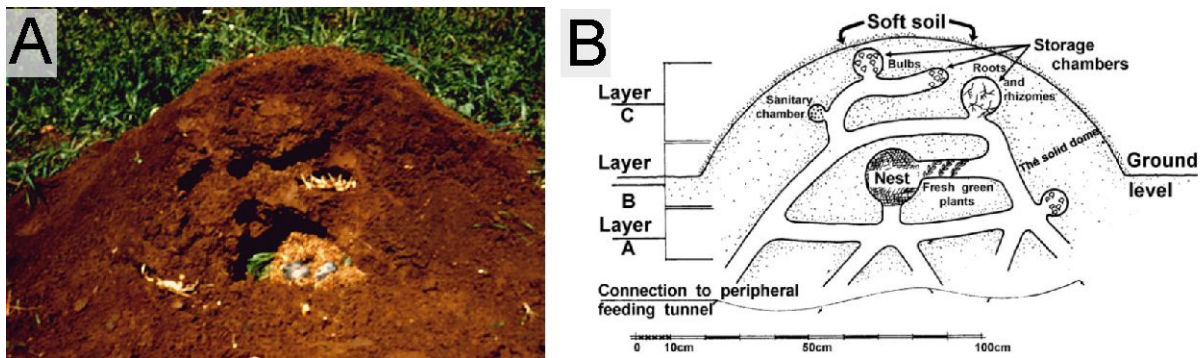


Abbildung 1-4: (A) *Spalax*-Bruthügel, halb geöffnet. (B) Querschnitt durch einen *Spalax*-Bruthügel. Die Ausdehnung der Bruthügel kann über ein Meter im Durchmesser sein (Abbildung Prof. Dr. A. Avivi).

Die Paarungszeit der Blindmäuse ist von November bis März, die Tragzeit beträgt etwa einen Monat. Weibliche Blindmäuse paaren sich im Alter von ca. zwei Jahren zum ersten Mal und werfen bis zu sechs Junge, die in den Bruthügeln aufgezogen werden. Meistens jedoch bekommen die Weibchen in ihrem Leben nur ein einziges Mal Nachkommen, die das Nest nach ca. vier bis sechs Wochen verlassen. Auch die Aufzucht der Brut erfolgt unterirdisch, wo es bei starkem Regen auch schon zu Sauerstoffmangelsituationen kommen kann.

Blindmäuse der Gattung *Spalax* sind zu unterschiedlichen Tageszeiten aktiv. Äußerst selten kommen Blindmäuse nachts auch an die Erdoberfläche, um im Schutz der Dunkelheit dort herumzustöbern. Blindmäuse leben solitär, sind sehr territorial und aggressiv gegen Eindringlinge. Die Größe des Territoriums hängt von der Spezies, der Population, dem Habitat, dem Alter und dem Geschlecht ab. Populationsdichten reichen von 0,1 bis 23 Individuen pro Hektar. Es gibt einen leichten Weibchenüberschuss (Carleton und Musser 1984; Nowak 1999; Nevo 1999). Die Lebenserwartung der Spalacidae beträgt in der Wildnis

EINLEITUNG

im Durchschnitt drei Jahre, maximal viereinhalb. Es wurde berichtet, dass Einzelindividuen von *Spalax* in Gefangenschaft 12-15 Jahre alt werden können (Nevo 1999; Nowak 1999). Nacktmulle der Art *Heterocephalus glaber* (Bathyergidae) leben in Gefangenschaft sogar mehr als 28,3 Jahre und sind somit die Nagetiere mit der längsten Lebenserwartung (Buffenstein und Jarvis 2002; Buffenstein 2005). Dagegen leben Mäuse, die fast gleichgroß sind, nur ca. drei bis vier Jahre (Andziak et al. 2005).

1.3.5.6 Physiologische und molekulare Anpassungen in Spalax an ein Leben unter Hypoxie

Spalax hat neben den morphologischen Besonderheiten auch auf physiologischer Ebene eine Reihe von Anpassungen an das unterirdische Leben entwickelt, die es ihm wie keinem anderen Nagetier erlauben, Sauerstoffmangelzustände zu überleben. Unter Laborbedingungen überlebt *Spalax* 3 % O₂ sowie 15 % CO₂ für bis zu 14 h ohne Ausfallerscheinungen. Laborratten hingegen sterben schon nach 2,5 h bei 3 % oder 4 h bei 6 % O₂-Gehalt der Umgebungsluft (Avivi et al. 1999; Avivi et al. 2005). Unter natürlichen Feldbedingungen wurden Konzentrationen von minimal 7,2 % O₂ und maximal 6,1 % CO₂ in den *Spalax* Bruthügeln gefluteter schwerer Böden während der Regensaison gemessen (Shams et al. 2005). Während langer Trockenperioden erreichten die Sauerstoffkonzentrationen nahezu oberirdisches Niveau (17-21 %), wobei der CO₂-Gehalt zwischen dem atmosphärischen Wert von 0,03 und 0,2 % schwankte.

Für die Anpassung an Hypoxie sind eine Reihe von metabolischen und molekularen Besonderheiten beschrieben worden:

Metabolismus: *Spalax* erreicht z. B. während des Grabens der Gänge trotz hochgradig hypoxischer und hyperkapnischer (hohe CO₂-Konzentrationen) Zustände hohe Metabolismusraten. Unter normalen Sauerstoffbedingungen und in Ruhepausen hat *Spalax* einen niedrigen, arrhythmischen Herzschlag von etwa 142 Schlägen pro Minute. Im Vergleich dazu hat die Ratte eine Herzfrequenz von durchschnittlich 314 Schlägen pro Minute (Storier et al. 1981). Unter Hypoxie hingegen steigt die Herzfrequenz bei der Ratte um ca. 120 %, bei *Spalax* steigt sie um 230 % auf den zweifachen Wert der Herzfrequenz der Ratten unter gleichen Bedingungen (Arieli und Ar 1981). Diese Umstände zeigen, dass die beiden Spezies zwei grundlegend unterschiedliche Mechanismen besitzen, mit Sauerstoffmangelsituationen umzugehen. Die Ratte versucht, unter Hypoxie durch Herunterregulation des kompletten

EINLEITUNG

Metabolismus Sauerstoff einzusparen. *Spalax* hingegen versucht, der Luft den restlichen Sauerstoff zu entziehen, bzw. durch Grabbewegungen einer extremen Sauerstoffmangelsituation zu entkommen. Eine weitere Möglichkeit der Adaptation an Hypoxie ist, dass derjenige Stoffwechselweg eingeschlagen wird, der pro definierter Menge Sauerstoff die größte Menge an ATP produziert (Hochachka und Lutz 2001).

Vaskularisierung und Blut: Bei gleichem Körpergewicht hat *Spalax* eine um ca. 22 % reduzierte Muskelmasse gegenüber Ratten. Das Fraktionsvolumen der Mitochondrien hingegen ist bei *Spalax* 46 % größer als bei der Ratte (Widmer et al. 1997). Weiterhin sorgen strukturelle Anpassungen in der *Spalax* Lunge für eine um 44 % verbesserte pulmonale Diffusionskapazität, was zu einer besseren O₂-Versorgung unter Hypoxie führt (Widmer et al. 1997). Dieser Wert berücksichtigt das Lungenvolumen, das Volumen alveolarer Septen sowie die alveolare Oberfläche und die Dicke der Barriere zwischen der Lungenoberfläche und den Erythrocyten. Die Sauerstofftransportkapazität des Blutes der beiden Nagere unterscheidet sich hingegen nicht (Widmer et al. 1997). Untersuchungen haben gezeigt, dass Hämatokrit- und Hämoglobingehalt sich in den verschiedenen *Spalax*-Spezies unterscheiden, v. a. in Korrelation mit der Permeabilität des Bodens für Gase (Arieli et al. 1986). Die Hämatokrit-Werte der Arten, die in humiden Klimaten wohnen (*S. galili* (2n=52) und *S. carmeli* (2n=58)), liegen höher als die von überirdisch lebenden Säugetieren, jedoch auf dem gleichen Level wie bei anderen Höhlen bewohnenden Nagern oder dem Erdhörnchen. Weitergehende Untersuchungen haben im *Spalax* Skelett-Muskel eine zweifach höhere Vaskularisierung als im Muskel von Ratten gefunden, was zu einer erleichterten O₂-Diffusion führt. Im Gehirn der beiden Spezies wurde ein solcher Unterschied in der Kapillarisation jedoch nicht festgestellt (Avivi et al. 1999).

Molekulare Anpassungen: Auf der Ebene der Genexpression gibt es ebenfalls mehr oder weniger gute Anpassungen von *Spalax* gegenüber der Ratte, die auf eine verbesserte Strategie hinweisen, mit Sauerstoffmangel umzugehen.

Globine: Das *Spalax* Hämoglobin wurde in den beiden chromosomalen Spezies *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) untersucht (Kleinschmidt et al. 1985). Auf Aminosäuresequenzebene gibt es beim Vergleich der α - und β -Ketten zwischen *Spalax*, Maus und anderen Nagern keine Anzeichen für eine Anpassung an das Leben unter Tage.

Von Myoglobin (Mb), dessen Expression im Skelettmuskel untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass auf Proteinebene der Myoglobingehalt in *Spalax* dreifach stärker ist als in der

EINLEITUNG

Ratte (Widmer et al. 1997). Im Gegensatz dazu wurde im Herzen von *Spalax* nur eine vernachlässigbar höhere Expression von Mb gefunden. Dies spricht eindeutig dafür, dass durch die höhere Sauerstoffverfügbarkeit im Skelettmuskel eine physiologische Präadaptation von *Spalax* an die teilweise stark hypoxische Umgebung vorliegt.

Diese verstärkte Verfügbarkeit von Sauerstoff im Skelettmuskel einer grabenden hypoxieresistenten Art, im Vergleich zu einer überirdisch lebenden hypoxiesensitiven Art, gibt es nicht nur im Nagetier-Vergleich von *Spalax* und Ratte, sondern auch beim Vergleich von insektivoren Maulwürfen der Familie Talpidae. Der semi-aquatische Sternmull (Sternnasenmaulwurf; *Condylura cristata*), der beim Tauchen nach Nahrung Hypoxien überstehen muss, hat eine höhere Sauerstoffverfügbarkeit im Muskel von immerhin 16,4 %, sowie einen Muskelmyoglobingehalt von 19,5 % gegenüber landlebenden Küstenmaulwürfen (*Scapanus orarius*) (McIntyre et al. 2002). Im Vergleich zum Amerikanischen Spitzmull (*Neurotrichus gibbsii*) war der Myoglobingehalt sogar um 54,2 % höher. Diese Tendenz ist ebenfalls bemerkenswert, jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt wie beim *Spalax*-Ratte-Vergleich, wo die Unterschiede in der Hypoxietoleranz größer sind, da die Ratte in der Regel keinem Sauerstoffmangel ausgesetzt ist. Der geringere Unterschied bei den Talpiden kommt daher, dass alle drei Spezies grabend sind. Die Art mit der höchsten Sauerstoffverfügbarkeit sind die zusätzlich zum Graben noch tauchenden Tiere, die mit dem geringsten O₂-Gehalt sind die teilweise auch an der Oberfläche lebenden Tiere. Der Muskelmyoglobingehalt korreliert also mit dem Sauerstoffmangel, den die Tiere überleben müssen.

VEGF: Die oben beschriebene höhere Vaskularisierung v. a. des *Spalax*-Muskels im Vergleich zur Ratte resultiert aus der stärkeren transkriptionellen Aktivität des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (*vascular endothelial growth factor* Vegf), der die Gefäßbildung steuert (Breen 2007). Dieser Wachstumsfaktor wird durch den Transkriptionsfaktor Hif-1 α reguliert. Schon hierdurch wird ein höherer Vegf-Level in *Spalax* verständlich. Zusätzlich stabilisiert das RNA-bindende Protein HuR (Elavl1=embryonic lethal, abnormal vision, *Drosophila* homolog-like 1) die Vegf mRNA. Auch dieses Gen wird bereits unter normoxischen Bedingungen in *Spalax* um mehr als Faktor 20 stärker exprimiert als in der Ratte (Avivi et al. 2005).

EPO: Erythropoietin, der wichtigste Faktor für die Bildung der zirkulierenden Erythrozyten, ist in der Niere auf Ebene der mRNA schon unter normoxischen Bedingungen (entspricht in der Regel 21 % O₂) ca. 1,5-fach höher in *Spalax* exprimiert als in der Ratte. Unter

EINLEITUNG

hypoxischen Bedingungen wird der mRNA-Level in beiden Tierarten drastisch erhöht, sowohl mit Abnahme der O₂-Konzentration als auch mit Zunahme der Hypoxiedauer (Shams et al. 2004).

HIF: Auch Hif-1 α , der zusammen mit dem konstitutiv exprimierten Hif-1 β (=Arnt *Arylhydrocarbonreceptor-nuclear-transporter*) den aktiven Transkriptionsfaktor *hypoxia inducible factor 1* (Hif-1) bildet, zeigt in der *Spalax*-Niere eine um den Faktor zwei höhere normoxische Expression. Dies spricht dafür, dass *Spalax* gegenüber Hypoxie präadaptiert ist und somit solche Gene von vornherein stärker exprimiert als die Ratte, die zur Hypoxietoleranz beitragen. In Ratten ändert sich auf Ebene der Transkription unter zunehmender Stärke der Hypoxie die Expression des Gens für Hif-1 α nur leicht, in *Spalax* hingegen wird die Expression auf mRNA-Ebene auf über das doppelte des schon hohen normoxischen Wertes erhöht. Zusätzlich zu der bekannten Regulation von HIF auf Proteinebene (Stabilisierung des HIF-1 α unter Hypoxie) gibt es in *Spalax* eine Regulation bereits auf mRNA-Ebene (Wiener et al. 1996; Shams et al. 2004).

p53: Das Tumorsuppressorgen p53 kontrolliert zelluläre Antworten auf eine Reihe von Stress-Bedingungen, wie DNA-Schäden und Hypoxie, was zum Wachstumsstopp und/oder letztendlich zur Apoptose führt. Wie kürzlich gezeigt, enthält die p53 DNA-Bindedomäne von *Spalax* eine spezifische Aminösäuresubstitution. Diese Substitution vermindert den p53-Effekt, wodurch *Spalax*-Zellen unter Hypoxie erst später als z. B. menschliche Zellen apoptotische Signalwege einleiten, was zu einem verbesserten Überleben von *Spalax* führt (Avivi et al. 2007).

Global (Chip): Es wurden mit Hilfe der Microarray-Technologie Untersuchungen auf Gesamt-Genomebene durchgeführt und dabei beobachtet, welche Gene im *Spalax*-Skelettmuskel unter extremer Hypoxie von 3 % für acht Stunden reguliert sind, um somit potenziell zur Hypoxietoleranz von *Spalax* beizutragen. Die speziesspezifischen Genexpressions-Unterschiede wurden zwischen zwei verschiedenen gut an Hypoxie angepassten *Spalax*-Spezies untersucht und liegen vor allen Dingen bei Genen, die in die Angiogenese und Apoptose involviert sind (Avivi et al. 2006). Diese Daten zeigen, dass hypoxietolerantere Spezies ihr Überleben zum einen durch eine verstärkte Vaskularisierung (siehe Abschnitt VEGF), zum anderen durch eine verminderte Expression von Genen

EINLEITUNG

verbessern, die die Zelle in Apoptose führen. Wie die Expressionsuntersuchungen der verschiedenen Gene zeigen, ist vielen Genen gemeinsam, dass es eine Änderung bzw. Erhöhung der konstitutiven Expressionsniveaus in *Spalax* gibt (eigene Untersuchungen).

1.4 Globine

Globine spielen eine besondere Rolle bei der Anpassung von Organismen an Hypoxie (Barker 1957). Die funktionellen Eigenschaften der Globine tragen einen großen Teil zu der ungewöhnlichen Hypoxietoleranz einzelner Tiere bei. Hier sind z. B. die Streifengans (*Anser indicus*), die unter extrem geringem Sauerstoffpartialdruck das Himalaya-Gebirge überquert oder der Sperbergeier zu nennen, der gar in 11,3 km Höhe über dem Meeresspiegel fliegt (Weber und Fago 2004). Schon als Hannibal 218 v. Chr. mit Elefanten die Alpen überquerte, kam ihm eine besondere Eigenschaft des Hämoglobins dieser Tiere zu Gute. Elefanten der Art (*Elephas maximus*) besitzen eine Mutation, die für eine ungewöhnlich hohe O₂-Affinität sorgt, und somit als „Flachlandtier“ auch problemlos in größeren Höhen leben kann (Braunitzer et al. 1982).

Globine sind kleine, Porphyrin enthaltende Proteine aus etwa 150 Aminosäuren, die die Fähigkeit besitzen, Sauerstoff reversibel zu binden (Dickerson und Geis 1983). Sie wurden vor allem in Vertebraten gut untersucht (Bunn 1981), kommen jedoch auch in Prokaryoten, Protisten, Pilzen und Pflanzen vor (Hardison 1996; Weber und Vinogradov 2001; Freitas et al. 2004). Globine sind also eine „frühe Erfindung der Evolution“, wobei wenig Zweifel darüber besteht, dass das letzte gemeinsame Vorläufer-Globin schon vor ca. 1,8 Mrd. Jahren existierte (Hardison 1996; Freitas et al. 2004).

Für komplex gebaute Organismen wie Vertebraten ist es auch schon aufgrund der Körpergröße unmöglich, die Sauerstoffversorgung aller Zellen alleine über Diffusion aus der umgebenden Luft oder dem Wasser zu gewährleisten. Die parallele Entwicklung von Kreislaufsystemen und Sauerstoffbindeproteinen war also eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Entstehung komplexer Organismen. Daher ist für Hochleistungsorganismen ein Kreislaufsystem unumgänglich, das Sauerstoff zu den Orten des Verbrauchs hinleitet und entstehendes giftiges Kohlendioxid, das bei der Atmung anfällt, vom Körper wegleitet. Diesen Gastransport im Blut gewährleistet das **Hämoglobin** (Hb) in den Erythrocyten. Im Laufe der Evolution haben die Hämoglobine der Säugetiere ein breites Spektrum an funktionellen Eigenschaften erlangt, das gut an das innere Milieu der roten Blutzellen angepasst ist. Die Sauerstoffaffinitäten aller Vertebraten Hämoglobine sind stark

EINLEITUNG

pH abhängig. Dieser Bohr-Effekt hat starke physiologische Wichtigkeit, wodurch dem Tier erlaubt wird, O₂ und CO₂ in Lunge und Gewebe auszutauschen (Bunn 1981). Auch ist die Funktion von Hämoglobin durch organische Phosphate wie das 2,3-DPG (2,3-Diphosphoglycerat) reguliert. Dabei lagern sich negativ geladene Gruppen des 2,3-DPG an positiv geladene Gruppen z. B. der menschlichen desoxygenierten β -Hämoglobinkette an, was zu einer reduzierten Sauerstoff-Affinität führt. Ein weiterer Faktor, der die Affinität des Hämoglobins beeinflusst, ist die Kooperativität der vier Proteinketten bei Beladung mit bis zu vier möglichen Sauerstoffmolekülen. Die Affinität des Heterotetramers ($\alpha_2\beta_2$ -Typ) nimmt mit zunehmender Bindung von Sauerstoff zu, sodass die Bindung in den Lungenkapillaren z. B. des zweiten Sauerstoff-Moleküls leichter erfolgt als die des ersten Moleküls. Hierdurch wird die Aufnahme des Sauerstoffs auch unter geringer Außenkonzentration erleichtert. Im Gewebe hingegen sinkt die Affinität des Hämoglobins, sobald es ein O₂-Molekül abgibt. Dadurch wird die Abgabe der weiteren Sauerstoffmoleküle erleichtert.

Der von Hämoglobin aus dem Blut bzw. den Erythrozyten und den Kapillaren abgegebene Sauerstoff gelangt dann direkt oder mittels Diffusion zu den Zellen des Verbrauchs. Auch in den Zellen erfolgt eine Diffusion hin zu den Mitochondrien. In Muskelzellen z. B. gibt es das **Myoglobin** (Mb), das diese Diffusion erleichtern kann. Myoglobin dient dort jedoch auch als intrazellulärer Sauerstoffspeicher für Zeiten des Sauerstoffmangels z. B. während großer Beanspruchung des Muskels. Myoglobin, im Muskel im millimolaren Bereich exprimiert, versorgt den Muskel jedoch nicht nur mit O₂, sondern ist auch dazu in der Lage, giftiges Stickstoffmonoxid in unschädliches Nitrat umzuwandeln (Flögel et al. 2002; Review: Wittenberg und Wittenberg 2003).

Im Jahr 2000 wurde von den Arbeitsgruppen Prof. Dr. T. Burmester (Universität Hamburg; Burmester et al. 2000) und Prof. Dr. T. Hankeln (Universität Mainz) in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems ein neuartiges Globin gefunden (vgl. 1.4.2). Dieses **Neuroglobin** (Ngb), das im folgenden näher beschrieben wird, zeigt auf Proteinebene nur 20-25 % Aminosäure-Sequenzidentität zu Myoglobin (Mb) und Hämoglobin (Hb) und hat sich möglicherweise vor ca. 800 Millionen Jahren von der Linie zu den anderen Globinen hin abgespalten (Abbildung 1-6).

Ein weiteres kürzlich entdecktes Globin, das **Cytoglobin** (Cygb; Burmester et al. 2002; Trent und Hargrove 2002; Kawada et al. 2001), kommt vor allem in Fibroblasten-ähnlichen

EINLEITUNG

Zelltypen und in neuronalen Zellen vor. Cygb hat 30 % Aminosäure-Sequenzidentität mit Myoglobin, was auf einen gemeinsamen evolutionären Vorfahren der beiden Gene vor ca. 400 Millionen Jahren zu Beginn der Vertebraten-Radiation hindeutet (Abbildung 1-5, Abbildung 1-6).

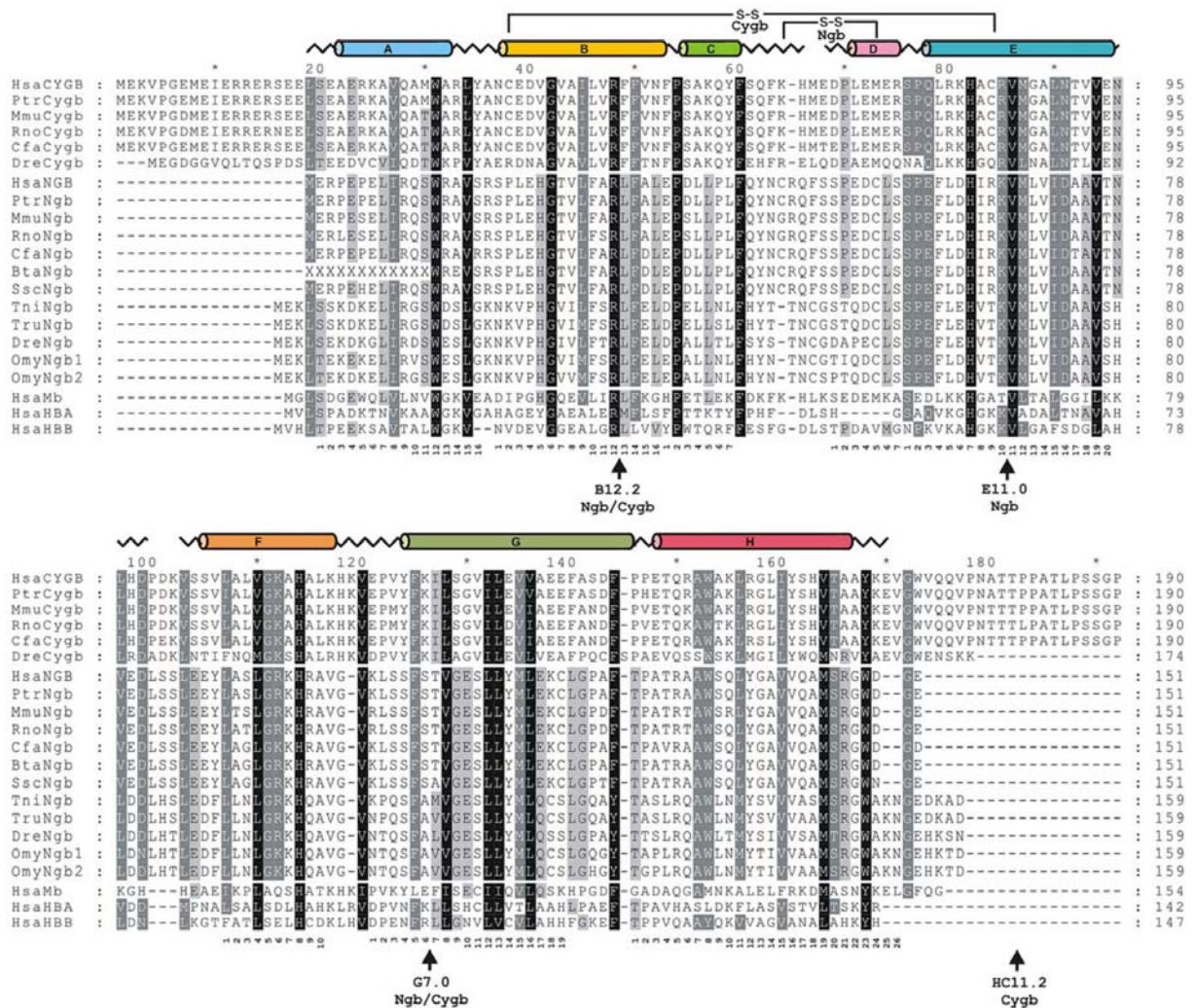


Abbildung 1-5: Aminosäure Sequenzalignment der Ngb und Cygb-Sequenzen, verschiedener Vertebraten Spezies, verglichen mit menschlichen Hämoglobin alpha- und beta-Ketten sowie menschlichem Myoglobin. Die Schattierung gibt unterschiedlich gut konservierte Aminosäure-Positionen an. Cysteine in Ngb und Cygb könnten für die Ausbildung von Disulfidbrücken verantwortlich sein. Intronpositionen sind durch Pfeile markiert (B12.2 z. B. bedeutet, dass das Intron im Gen zwischen der zweiten und dritten Codon-Position der 12. Aminosäure der B-Helix liegt). Die Abkürzung der Speziesnamen ist folgendermaßen: Hsa, *Homo sapiens*; Ptr, *Pan troglodytes*; Mmu, *Mus musculus*; Rno, *Rattus norvegicus*; Cfa, *Canis familiaris*; Bta, *Bos taurus*; Ssc, *Sus scrofa*; Tni, *Tetraodon nigroviridis*; Tru, *Takifugu rubripes*; Dre, *Danio rerio* and Omy, *Onchorhynchus mykiss*.

EINLEITUNG

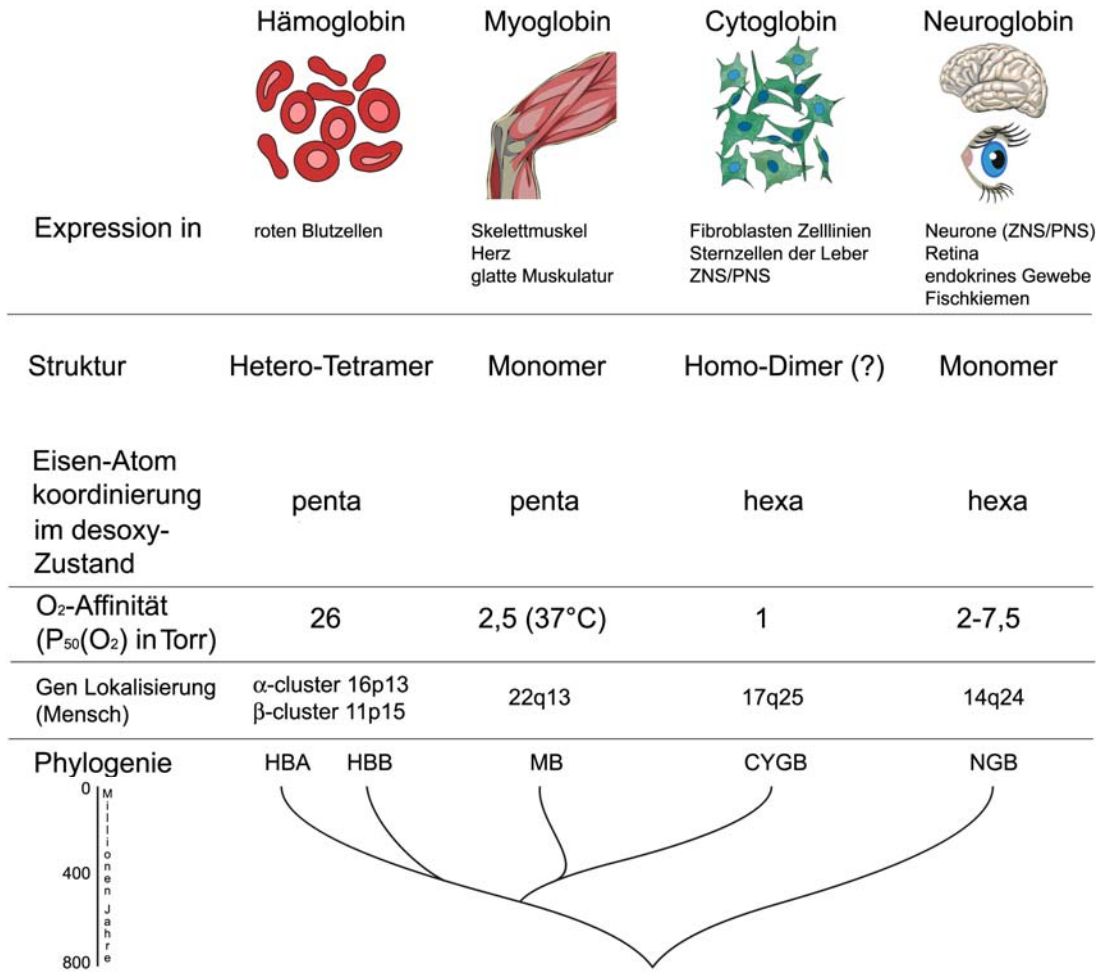


Abbildung 1-6: Übersicht über die bisher bei Säugetieren gefundenen vier verschiedenen Globintypen Häm-, Myo-, Neuro- und Cytoglobin (verändert nach Hankeln et al. 2005).

1.4.1 Neuroglobin und Cytoglobin: Proteinstruktur und Genexpression

1.4.1.1 Neuroglobin

Das Vertebraten-Neuroglobin ist ein Protein mit einer typischen Größe von ca. 151 Aminosäuren, abhängig von der betrachteten Tiergruppe. Neuroglobin ist ein Myoglobin-ähnliches monomeres Globin, das in der Lage ist, Sauerstoff reversibel zu binden (Burmester et al. 2000, Dewilde et al. 2001, Hamdane et al. 2003). NgB hat eine konservierte Globin-Faltung, die aus acht alpha-Helices A-H besteht (vgl. Abbildung 1-5). Neuroglobin war das erste in Vertebraten entdeckte hexakoordinierte Protein und demnach hat das Eisen-Ion des Häms auch im desoxygenierten Zustand sechs belegte Bindungsstellen. Dabei ist die sechste Koordinationsstelle durch das bewegliche distale Histidin an Position E7 (siebte Aminosäure der Helix E) belegt. Das Eisenion des Myoglobins hingegen hat im unbeladenen Zustand nur

EINLEITUNG

fünf Koordinationsstellen, da das distale Histidin nicht dazu in der Lage ist, die Bindungsstelle des Sauerstoffs einzunehmen (Abbildung 1-7; Couture et al. 2001; Dewilde et al. 2001; Trent et al. 2001; Burmester et al. 2002; Kiger et al. 2004). Diese Hexakoordinierung des Eisens ist auch bei einigen Bakterien-, einzelligen Eukaryoten-, Pflanzen-, und Invertebratenglobinen bekannt (Dewilde et al. 1996; Dewilde et al. 1998; Hargrove et al. 2000; Watts et al. 2001; Wittenberg et al. 2002). Bei der Bindung des externen Liganden (z. B. Sauerstoff) handelt es sich um eine zweiphasige Reaktion, erstens aus dem langsamen Schritt der Verdrängung des internen Liganden und zweitens aus dem schnellen Binden eines externen Liganden an das dann hoch affine Eisen-Atom (Dewilde et al. 2001; Brunori et al. 2005). Das Eisen-Atom kann vorliegen in Form von reduziertem Fe^{2+} (*ferrous*) oder oxidiertem Fe^{3+} (*ferric*). Nur im reduzierten Zustand ist das Globin in der Lage O_2 zu binden, nicht jedoch im oxidierten Zustand. Diese Oxidation findet z. B. dann statt, wenn oxygeniertes Hb oder Mb auf NO treffen. Dabei entsteht Nitrat und metHb oder metMb (Brunori et al. 2005). Aufgrund der hohen Tendenz zur Autoxidation ist anzunehmen, dass es in der Zelle eine Reduktase geben muss, die das Globin im reduzierten Zustand hält. Bisher wurde diese *in vivo* noch nicht identifiziert, jedoch wurde gezeigt, dass ein künstliches, fotoaktiviertes System aus NADH und FMN als Reduktase funktioniert (Brunori et al. 2005).

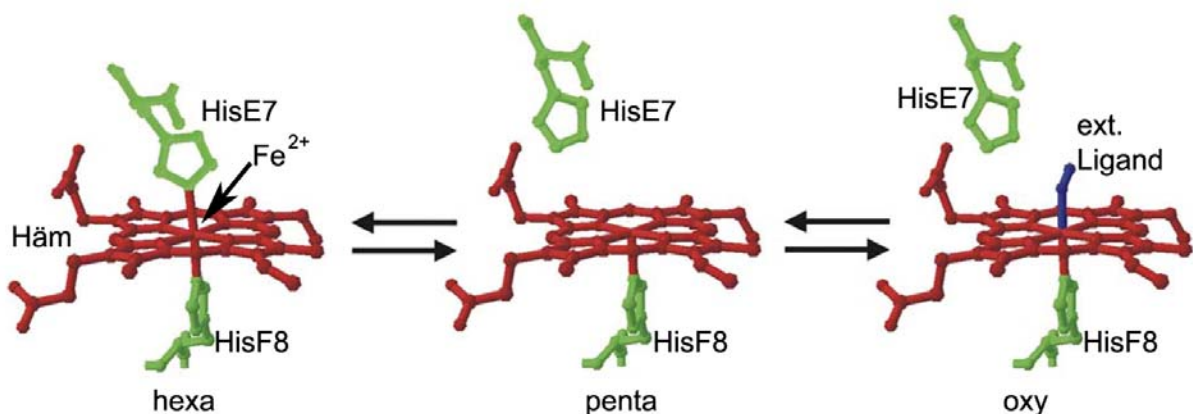


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Penta- und Hexakoordinierung sowie des Oxyzustandes von hexakoordinierten Globinen. Die einzelnen Zustände befinden sich im Gleichgewicht, abhängig vom Vorhandensein des externen Liganden, der z. B. O_2 , NO oder CO_2 sein kann (verändert nach Hankeln et al. 2005). Der hexakoordinierte Zustand kommt bei pentakoordinierten Globinen, wie dem Vertebraten Mb und Hb nicht vor.

Hamdane et al. (2003) haben herausgefunden, dass es *in vitro* beim menschlichen NGB zur Ausbildung einer internen Disulfidbrücke zwischen Cysteinen an den Positionen CD7 und D5

EINLEITUNG

kommen kann. Diese Brücke könnte unter reduzierenden Bedingungen aufbrechen, so etwa nach Anhäufung von Reduktionsäquivalenten NADH^+ als Antwort auf Hypoxie. Dieses Auflösen der Disulfidbrücke reduziert dann die Affinität zu O_2 um ca. Faktor 10, was zum Freisetzen von Sauerstoff und somit dem Abschwächen des hypoxischen Stresses führen könnte. Ob dieser Mechanismus *in vivo* funktioniert, ist noch nicht geklärt. Während Fische an ähnlicher Stelle auch ein Cystein besitzen, fehlt Nagern das Cystein an Position CD7 (Abbildung 1-5).

Untersuchungen der **Genexpression** von Ngb haben ergeben, dass in Vertebraten Ngb v. a. im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert wird. Dabei befindet sich die stärkste Expression in der Retina (Burmester et al. 2000; Hankeln et al. 2004; Schmidt et al. 2005). Es wurde bislang eine Expression in neuronalen Zellen gefunden und nicht in Gliazellen (Laufs et al. 2004). Das Mammalier-Ngb kommt zusätzlich auch in endokrinem Gewebe vor, wie der Adenohypophyse, der Nebenniere, den Testes (Reuss et al. 2002) und den Langerhans'schen Inseln (Geuens et al. 2003).

1.4.1.2 Cytoglobin

Cytoglobin besteht aus etwa 190 Aminosäuren und ist somit ein außergewöhnlich großes Globin, das im Vergleich zu den anderen Vertebraten-Globinen zusätzlich N- und C-terminale Extensionen besitzt (vgl. Abbildung 1-5). Es besteht wie Neuroglobin aus acht alpha-Helices A-H und ist ebenfalls ein in Säugern vorkommendes, hexakoordiniertes Globin (Kawada et al. 2001; Burmester et al. 2002; Trent und Hargrove 2002). Auch Cygb ist in der Lage, eine interne Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren CysB2 und CysE9 auszubilden, deren Aufbrechen zu einer zweifachen Reduktion der O_2 -Affinität führt (Hamdane et al. 2003). Wenngleich es keinen Beweis für das Ausbilden einer intermolekularen S-S-Brücke gibt, deuten kristallografische und biochemische Daten darauf hin, dass es auch zur Ausbildung eines Cygb-Homodimers kommen könnte (de Sanctis et al. 2004).

Die **Expression** von Cygb befindet sich in allen bislang untersuchten Geweben, jedoch nicht in allen Zelltypen. Die Hauptexpressionsorte sind Fibroblasten z. B. in Leber, Niere oder Herz sowie distinkte neuronale Zellpopulationen. In den Fibroblasten ist Cygb zytoplasmatisch lokalisiert, in Neuronen sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär (Schmidt et al. 2004).

Andere Untersuchungen sprechen von einer ausschließlich nukleären Lokalisation von Cygb (Geuens et al. 2003).

1.4.2 Mögliche Funktionen von Neuroglobin und Cytoglobin

In Anlehnung an die vielfältigen Funktionen von Hb und Mb sind auch für Ngb und Cygb Aufgaben ganz unterschiedlicher Natur denkbar, unter Umständen sogar in Kombination. Hb zum Beispiel, das in den Erythrozyten sehr stark exprimiert ist, ist nicht nur für den Sauerstofftransport im Blut hin zu den Zellen oder für den Abtransport des bei der aeroben Atmung anfallenden Kohlendioxids verantwortlich. Es bildet und transportiert u. a. auch das NO-Radikal, das eine Reihe wichtiger Funktionen, wie z. B. die eines neuronalen Signalmoleküls, übernimmt (Gödecke 2006; Gow 2005). Myoglobin, im Muskel im millimolaren Bereich exprimiert, versorgt den Muskel nicht nur mit O₂, sondern macht als Dioxygenase auch überschüssiges, zum Teil giftiges NO unschädlich (Flögel et al. 2001).

1.4.2.1 Mögliche Funktionen von Neuroglobin

- Ngb könnte für die *Speicherung von O₂* oder die *Erleichterung der intrazellulären Diffusion von O₂ hin zu den Mitochondrien* verantwortlich sein (Burmester et al. 2000; Dewilde et al. 2001; Trent et al. 2001). Für Myoglobin wurde diese Funktion in vielen Veröffentlichungen diskutiert (Merx et al. 2001; Wittenberg und Wittenberg 2003). Andere Publikationen sagen, dass die O₂-Affinität nicht kompatibel mit der Sauerstoffversorgungsfunktion zu sein scheint, weil in Neuronen zu geringe O₂-Partialdrücke herrschten und Ngb nicht affin genug wäre, um diesen Sauerstoff aufzunehmen (Fago et al. 2004). Dagegen sprechen jedoch Daten, die zeigen, dass die Sauerstoffpartialdrücke einiger Gewebe niedriger als der P₅₀-Wert von Ngb sind (Erecinska und Silver 2001).
- Vorstellbar wäre weiterhin eine Funktion als *Sauerstoffsensoren* wie er von Globinen in diversen Arten beschrieben ist (Hargrove et al. 2000; Hou et al. 2001; Hou et al. 2001; Kriegl et al. 2002). Dabei wird die intrazelluläre Sauerstoffkonzentration gemessen, was z. B. unter Hypoxie zur Folge hat, dass intrazelluläre respiratorische Prozesse ablaufen, bestimmte Signalwege eingeschaltet oder abgeschaltet werden. Diese Funktion wurde v. a. in prokaryotischen Systemen untersucht (Freitas et al. 2005).
- Ngb könnte die Funktion einer *terminalen Oxidase* erfüllen, um unter hypoxischen Bedingungen NAD⁺ zur Unterstützung von Glykolyse und Aufrechterhaltung der

EINLEITUNG

ATP-Produktion zu regenerieren, wie es für Mais-Hämoglobin beschrieben ist (Sowa et al. 1998).

- Ngb könnte *reaktive Sauerstoff- oder Stickstoff-Spezies* (ROS oder RNS) entgiften, die u. a. nach Reperfusion bzw. Reoxygenierung nach einem Schlaganfall entstehen, also einem plötzlichen „Zuviel“ an Sauerstoff. ROS entstehen jedoch nicht nur nach Schlaganfall, sondern allgemein auch schon nach dem Auftreten hypoxischer Zustände (Halliwell 2006). Diese Funktion wird von Herold und Fago (2005) deshalb propagiert, weil Ngb wahrscheinlich Redoxreaktionen durchläuft, um Neurone gegen oxidative und potenziell pathogene Stoffe zu schützen, die nach Hypoxie oder Ischämie auftreten. Ein großes Schadenspotenzial wird z. B. Peroxinitrit (ONOO^-) zugeschrieben, das aus der Reaktion von Superoxid-Anion (O_2^-) und Stickstoffmonoxid (NO^\cdot) entsteht (Herold und Fago 2005). NO^\cdot entsteht als Reaktion auf Hypoxie oder Ischämie und verbleibt wahrscheinlich bis zu mehreren Stunden im Körper (Lipton 1999). Eine kürzlich hergestellte Ngb-überexprimierende Maus sollte bei der Aufklärung der Funktion helfen (Khan et al. 2007). Diese Maus zeigt starke protektive Effekte bei zerebraler Ischämie und Ischämie des Myokards (Khan et al. 2006; Greenberg et al. 2007).
- Auch eine *Stickstoffmonoxid-Dioxygenasefunktion* könnte von Neuroglobin wahrgenommen werden, die dazu benötigt wird, unter Sauerstoffverbrauch schädliches NO in harmloses Nitrat umzuwandeln. Diese Funktion wurde schon für Mb (Flögel et al. 2001; Merx et al. 2005) und Hb (Gardner 2005; Gardner et al. 2006) in Säugetieren beschrieben. Auch einige Flavo-Hämoglobine in der Hefe (Liu et al. 2000) und das verkürzte (*truncated*) Hämoglobin bei *Mycobacterium bovis* (Ouellet et al. 2002), dem Erreger von Tuberkulose bei Rindern sowie das *Ascaris*-Hämoglobin (Minning et al. 1999), besitzen NO-Dioxygenasefunktion. Paul Gardner (College of Medicine, Cincinnati, USA), der die NO-Dioxygenasefunktion (NOD) von Ngb untersucht hat, konnte sie bislang nicht nachweisen (unveröffentlicht).
- Es wäre denkbar, dass Ngb für zytoplasmatische Enzymreaktionen, die molekularen Sauerstoff benötigen, diesen *anliefert* oder *bereithält*. Auch *Enzymreaktionen* selbst könnten von Ngb ausgeübt werden. Jedoch wurden bislang keine Aktivitäten gefunden. Zu den untersuchten Funktionen gehören Superoxide-Dismutase, Katalase und Peroxidase Aktivitäten (Trandafir et al. 2007).

1.4.2.2 *Mögliche Funktionen von Cytoglobin*

Für Cygb kommen grundsätzlich die gleichen Funktionen wie für Ngb beschrieben in Frage (vgl. 1.4.2.1). Dazu gehören eine *Speicherfunktion von O₂*, ebenso wie eine *Erleichterung der intrazellulären Diffusion hin zu den Mitochondrien*, wo dieser für den Ablauf der Atmungskette nötig ist (Burmester et al. 2002). Vorstellbar wäre auch eine Funktion als *Sauerstoffsensor* (Hargrove et al. 2000; Kriegl et al. 2002) oder terminale Oxidase-Funktion, wie für Mb beschrieben (Sowa et al. 1998). Auch könnte Cygb dazu dienen, schädliches NO in harmloses Nitrat umzuwandeln, wie für Mb und verschiedenste weitere Globine beschrieben (Minning et al. 1999; Liu et al. 2000; Flögel et al. 2001; Ouellet et al. 2002; Merx et al. 2005). Aufgrund seiner besonderen Expressionsmuster sind bei Cytoglobin die nachfolgenden Funktionen jedoch nahe liegender:

- Viele zytoplasmatische Enzymreaktionen benötigen molekularen Sauerstoff, der von Cygb in ausreichender Menge bereitgestellt werden könnte. Hierbei wäre v. a. eine Versorgung von Prolyl-Hydroxylasen zu nennen, die für die Kollagensynthese in Fibroblasten verschiedenster Gewebe, neben Neuronen die Hauptorte der Cytoglobin-Expression, Sauerstoff benötigen (vgl. 1.4.1.2). Hinweise darauf liefern Versuche, bei denen Fibroblasten-Zelllinien des Typs NIH 3T3 mit einem Cygb-Expressionskonstrukt transfiziert wurden (Nakatani et al. 2004). Parallel zur Transfektion wurde die Produktion der Kollagen $\alpha 1$ (I)-Kette durch TGF- β (Transforming Growth Factor beta) angeregt, was in transfizierten Zellen zu einer verstärkten Kollagenproduktion im Vergleich mit nicht-transfizierten, aber dennoch mit TGF- β behandelten Zellen führte.
- Eine weitere mögliche Funktion, die mit der nukleären Lokalisation von Cygb in Neuronen vereinbar wäre, könnte sein, dass es potenziell mit anderen kernlokalisierten Proteinen wie Transkriptionsfaktoren interagieren kann, die auf einen externen Stimulus reagieren und Genexpression steuern.
- Cygb könnte bei der *Entgiftung von ROS oder RNS* dienen, z. B. nach Reoxygenierung im unmittelbaren Anschluss an kardiovaskuläre Krankheiten wie Schlaganfall oder Herzinfarkt. Kawada et al. (2001), die Cygb parallel zu Burmester et al. (2002) als STAP (*stellate cell activation-associated protein*) beschrieben haben, spekulieren, dass das Protein als Entgifter von Peroxiden dient, die in der fibrotischen Leber von Ratten entstehen. Weitere Untersuchungen mit Cygb-überexprimierenden Neuroblastoma-Zellen haben gezeigt, dass Behandlung mit Wasserstoffperoxid zu

EINLEITUNG

einer verstärkten Expression von Cygb führt, was auf eine protektive Funktion im Gehirn hinweist (Li et al. 2007). Auch die *knock-down*-Versuche dieser Arbeitsgruppe in den gleichen Zellen bestätigen diese Funktion von Cygb, denn die Zellschädigung durch H_2O_2 in Zellen, die Cygb vermindert exprimieren, wurde verschlimmert, was heißt, dass mehr Zellen starben (Li et al. 2007).

- Für Cygb gibt es Hinweise darauf, NO-Dioxygenase-Aktivität zu besitzen, jedoch ist die Bildung von Nitrat aus NO-Radikalen und der Reaktion mit Sauerstoff, abhängig vom Zelltyp (v.a. in Endothelzellen), unterschiedlich stark (Paul Gardner, unveröffentlicht).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Neuroglobin und Cytoglobin sind zwei kürzlich entdeckte Globine. Da man bislang die exakten physiologischen Funktionen dieser Proteine nicht kennt, sollten in dieser Arbeit Untersuchungen zur Expression dieser Gene bzw. Proteine angefertigt werden. Hintergrund dieser Untersuchungen ist die Frage, ob die beiden Globine die O_2 -Versorgung sicherstellen oder ob andere Funktionen wahrscheinlicher sind. Dazu sollten Untersuchungen unter Sauerstoffmangelbedingungen an unterschiedlichen Typen von Säugern als Tiermodelle durchgeführt werden. Zum einen sollte die hypoxietolerante Blindmaus *Spalax ehrenbergi* mit der hypoxiesensitiven Wanderratte *Rattus norvegicus* verglichen werden. Zum anderen sollte ein weiterer hypoxiesensitiver Säuger auf seine Globingenexpression hin untersucht werden. Im Einzelnen sollten die nachstehenden Ziele verfolgt werden:

- In *Spalax* sollte untersucht werden, ob die Gene für Ngb und Cygb auf Sequenzebene distinkte Anpassungserscheinungen zeigen.
- Die Gensequenz der kompletten Myoglobin-mRNA aus *Spalax* sollte bestimmt werden.
- Auf Genexpressionsebene (mRNA, Protein) der verschiedenen Globingene sollte der zwischenartliche Vergleich von Ratte und *Spalax* zeigen, ob es Präadaptationen in *Spalax* an das Leben unter begrenzter Sauerstoffverfügbarkeit gibt, da dieser Organismus natürlicherweise Hypoxie ausgesetzt ist.
- Die Genexpressionuntersuchung sollte zeigen, wie die Globingene unter Hypoxie reguliert werden und ob es auch dabei besondere Anpassungen in *Spalax* gibt.

EINLEITUNG

- Die Ngb und Cygb Expression sollte auf zellulärer Ebene, sowie qualitativ im Gehirn von *Spalax* und Ratte analysiert werden. Ziel war es herauszufinden, ob es in der zellulären Lokalisation zwischen hypoxiesensitiven und hypoxieresistenten Tierarten Unterschiede gibt, die zu einer besseren Überlebensfähigkeit von *Spalax* führen.
- In der Retina von *Spalax* sollte die zelluläre Protein-Expression untersucht und mit vorhandenen Daten von Maus und Ratte verglichen werden, um aus der „blinden Retina“ von *Spalax* möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion von Ngb und Cygb zu erhalten. Zusätzlich sollte eine Kolo-kalisation in der Retina mit potenziell funktionsnahen Proteinen durchgeführt werden. Eine quantitative Untersuchung der Gene für Ngb und Cygb auf mRNA-Ebene sollte erfolgen.
- Die Myoglobin-Expression sollte im Skelett- und Herzmuskel untersucht werden. Ziel war es, die Expression von Mb mit den neuartigen Globinen zu vergleichen, um somit Rückschlüsse auf die Funktion von Ngb und Cygb zu ziehen.
- Mit dem Hausschwein sollte ein weiterer hypoxiesensitiver Organismus auf seine Expression nach Hypoxie mit anschließender Reperfusion auf die Ngb und Cygb-Expression hin untersucht werden. Dieses Tier diene auch als operatives Modell für Kinder mit angeborenen Herzfehlern. Im Gehirn dieser Tiere sollte die Expression auf mRNA-Ebene untersucht und auf eine protektive Funktion hin überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurden 2 g bei -80 °C tiefgefrorenes Lebergewebe verwendet. Dieses wurde mit 4 ml Homogenisierungspuffer und 600 µl Triton X-100 homogenisiert, nach Zentrifugation mehrmals mit Homogenisierungspuffer gewaschen und zuletzt in 2 ml dieses Puffers resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde eine Behandlung mit einer Spatelspitze Proteinase K und 0,1 Vol. 10 % SDS durchgeführt. Die benötigte Salzkonzentration wurde mit 0,1 Vol. 10 x Dialysepuffer eingestellt. Die Zelllyse erfolgte bei 60 °C für eine Stunde. Es wurden dann 0,1 Vol. gesättigtes Tris-HCl (pH 8,5) und 0,25 Vol. 5 M NaClO₄ hinzugegeben. Die Aufreinigung der DNA-Lösung erfolgte durch wiederholte Zugabe von 1 Vol. eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, bis keine Interphase mehr erkennbar war. Um restliches Phenol aus der wässrigen Phase heraus zu lösen, wurde eine abschließende Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Die wässrige DNA enthaltende Phase wurde mit 0,1 Vol. 10 x Dialysepuffer und 2 Vol. Ethanol abs. überschichtet und auf einen sterilen Glasstab aufgewickelt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer gelöst.

2.1.2 Verdau und Fällung von DNA

Der Verdau von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen verschiedener Hersteller entsprechend den jeweils angegebenen Bedingungen. Es wurden die Produkte der folgenden Firmen verwendet: Roche Diagnostics, Fermentas und GE Healthcare (Firmensitze siehe Firmenverzeichnis 2.12). Wurde eine DNA mit zwei Enzymen geschnitten, die unterschiedliche Pufferbedingungen erforderten, wurden zwei aufeinander folgende Verdaus durchgeführt. Das Entfernen der Salze nach Schneiden mit dem ersten Enzym erfolgte durch Ausfällung der DNA entsprechend nachstehender Vorschrift: Zur Fällung von DNA wurden 0,1 Vol. 10 x Dialysepuffer sowie 2 Vol. vorgekühltes Ethanol abs. hinzugegeben. Für den Fall, dass auch kurze DNA-Fragmente kleiner als 50 Bp gefällt werden sollten, wurde anstelle des Dialysepuffers 3 M Natriumacetat (pH 4,5) verwendet. Dieser Ansatz wurde gemischt und für mindestens 30 Minuten bis ü. N. bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA

bei 16.000 bis 21.000 g für mindestens 30 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 70 %igem Ethanol sowie Zentrifugation für 5-10 min wurde die DNA gewaschen. Nach Trocknung in einer Vakuum-Zentrifuge (Eppendorf Concentrator) bei Raumtemperatur wurde die DNA in hochreinem HPLC-Wasser (Carl Roth) oder TE-Puffer gelöst.

2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Auftrennung von DNA. Die Auftrennung von DNA-Molekülen im elektrischen Feld wurde mit Hilfe von vertikalen 0,8 bis 2 %igen Agarosegelen in der *GENterphorese Gelelektrophoresekammer* (GENterprise Genomics) bei einer Spannung von 120 bis 150 V durchgeführt. Als Puffer zum Lösen der Agarose und als Laufpuffer diente 1 x TBE- bzw. 1 x E-Puffer, abhängig von der aufzutrennenden Fragmentgröße und der Laufzeit. Das Aufkochen der Agarose (GENterprise Genomics) im jeweiligen Puffer erfolgte in einer Mikrowelle solange, bis die Lösung schlierenfrei war. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,2 Vol. DNA-Ladepuffer versetzt. Die Anfärbung der DNA-Fragmente im Agarosegel erfolgte für 5 min im Anschluss an die Elektrophorese in Ethidiumbromid-haltigem 1 x E-Puffer (5 µg/ml). Die gefärbten DNA-Moleküle wurden auf einem UV-Transilluminator mit 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und mit einem *Image Documentation System CSI* (Cybertech) fotografiert. Als Molekulargewichtsstandard dienten Hind III verdaute λ -DNA und mit Eco RI und Hind III doppelt verdaute pF-DNA sowie verschiedene synthetische DNA-Leitern der Firma Fermentas.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels des *E.Z.N.A. Gel Extraction Kits* (PeqLab). Die Extraktion wurde laut Protokoll des Herstellers durchgeführt, jedoch mit der Abwandlung, dass zur Elution der DNA von den Silica-Säulen nicht TE-Puffer, sondern HPLC-Wasser verwendet wurde, um eine anschließende Sequenzierungsreaktion zu verbessern.

Auftrennung von RNA. Die Auftrennung der RNA erfolgte auf einem 1-1,2 %igen denaturierenden, 15 % Formaldehyd enthaltenden Agarosegel. Dazu wurden 0,3 g Agarose mit 22,5 ml DEPC-Wasser vermischt und in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Lösung schlierenfrei war. Anschließend wurden 3 ml 10 x MOPS-Puffer hinzugegeben, und die Lösung wurde im 60 °C Wasserbad für 5 min abkühlen gelassen. Es wurden 4,5 ml Formaldehyd (37 %) hinzugegeben, und nach dem Vermischen wurde das Gel gegossen. Als Laufpuffer der Formaldehyd-haltigen RNA-Gele diente 1 x MOPS-Puffer. Zu untersuchende

MATERIAL UND METHODEN

RNA-Moleküle wurden unter RNase-freien Bedingungen mit 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) und 3 Vol. RNA-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Nach sofortiger Abkühlung auf Eis wurden 0,1 Vol. RNA-Färbelösung hinzugegeben, der Ansatz vermischt und auf das RNA-Gel aufgetragen.

2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem Volumen von 50 µl in einem Thermocycler *Primus 96 Advanced* (PeqLab) durchgeführt. Von der zu untersuchenden Matrizen-DNA wurden entweder 50 ng cDNA bzw. 500 ng genomische DNA eingesetzt. Die Endkonzentration der beiden Primer betrug standardmäßig 200 nM, die der einzelnen dNTPs 200 µM. Die eingesetzte Menge an Taq-DNA-Polymerase (Taq-Polymerase, Sigma; AmpliTaq Gold HotStart Polymerase, Applied Biosystems; Accuprime DNA-Polymerase, Invitrogen) betrug 1 U. Zur Amplifikation großer Produkte wurde das *Expand Long Template PCR System* (Roche Diagnostics) verwendet.

Die PCR-Bedingungen wurden folgendermaßen gewählt: 3 min Denaturierung bei 94 °C (zur Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystems) in Verbindung mit „Gold-Puffer“ 7 min) und in 40 Zyklen 94 °C Denaturierung für 15 s, 55 °C bis 65 °C Primerbindung für 30 s (abhängig von der Schmelztemperatur der Primer) und 72 °C Primerelongation 30 s bis 4 min, abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA. Dabei wurde in etwa eine Minute Elongationszeit pro kBp berechnet. Für die Verwendung der Accuprime DNA-Polymerase (Invitrogen) wurde eine Elongationstemperatur von 68 °C verwendet. Zum vollständigen Auffüllen der Enden wurde abschließend für weitere 5 min bei 72 °C polymerisiert.

Die Auftrennung von PCR-Produkten erfolgte mit 1,2-2 %igen Agarosegelen. Zum Durchführen nachfolgender Applikationen wie Klonierung oder Sequenzierung erfolgte zunächst eine Aufreinigung mittels *E.Z.N.A. Cycle Pure Kit* (PeqLab), wobei die DNA mit Wasser von der Säule eluiert wurde.

2.1.5 Klonierung von PCR-Produkten und Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des Plasmidvektors *pGEM[®]-T Easy* (Promega) nach Angaben des Herstellers (siehe Anhang 5). Ligationen wurden mit der T4-

DNA-Ligase in einem Mg^{2+} enthaltenden Puffersystem ü. N. bei 4 °C durchgeführt (1-5 U.). Der zur Transformation mittels Elektroporation (EquiBio Easyject Prima, 2500 V, PeqLab; Calvin und Hanawalt 1988) verwendete Bakterienstamm war *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen). Dieser Stamm ist endonukleasefrei (*end*). Die Überprüfung auf rekombinante Bakterien erfolgte auf Ampicillin- und X-Gal/IPTG-haltigen Agarplatten mittels der „Blau-Weiß“ Selektion (Winnacker, 1987). Aus transgenen Klonen wurden die Plasmide mittels *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit* (PeqLab) isoliert, der endonukleasefreie Bakterienstämme benötigt. Abweichend vom Protokoll wurde die DNA mit 50 µl HPLC-Wasser von der Silica-Säule gelöst, um anschließende Sequenzierungsreaktionen zu verbessern.

2.1.6 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe von Kits verschiedener Hersteller. Dazu wurde das Gewebe bis zu seiner Verwendung bei -80 °C gelagert.

- *Trizol-Reagenz* (Sigma-Aldrich): Diese Methode beruht auf der Verwendung eines phenolhaltigen Extraktionspuffers. Dabei können aus einer einzigen Probe in nacheinander durchgeführten Extraktionen sowohl RNA, DNA und Proteine isoliert werden. Für die Isolierung wurden 50 mg Gewebe eingesetzt. Nach verschiedenen Wasch- und Aufreinigungsschritten wurde die RNA in RNase-freiem Wasser gelöst. Vor Verwendung der RNA für reverse Transkriptionsreaktionen wurde stets ein DNase I-Verdau durchgeführt (vgl. 2.1.8). Mit dieser Methode wurden im Vergleich zu den nachfolgenden Methoden größere Mengen an RNA hergestellt.
- *RNeasy Mini Kit* (Qiagen): Diese Methode beruht auf der Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe von Silica-Säulen. Es wurden 30 mg Gewebe eingesetzt. Ein anschließender Verdau der RNA mit DNase I (vgl. 2.1.8) ist auch bei dieser Methode notwendig.
- *SV Total RNA Isolation System* (Promega): Für diese auf Silica-Säulen beruhende Extraktionsmethode wurden 30 mg Gewebe eingesetzt. Das System sieht bereits einen DNase I-Verdau direkt auf der Säule vor.

Die Integrität der RNA-Proben wurde auf denaturierenden Formaldehydgelen überprüft (vgl. 2.1.3) und die Konzentration und Reinheit mit Hilfe von optischer Dichte-Messung bei 260 bzw. 280 nm bestimmt (*Nanodrop ND-1000* und *Eppendorf Biophotometer*). Es wurden ausschließlich RNA-Proben verwendet, die auf den denaturierenden Formaldehydgelen deutliche 18 S- und 28 S-rRNA-Banden zeigten, die weitaus stärker erschienen als möglicherweise vorhandene degradierte RNA, wodurch diffuse Spuren sichtbar wurden.

MATERIAL UND METHODEN

Hochreine RNA hat ein $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ -Verhältnis von größer als 2. Die große Mehrheit der eingesetzten Proben erreichte diese Reinheitsstufe, jedoch wurden z. T. auch Proben mit einem Quotienten von lediglich über 1,8 eingesetzt. Bei Messungen mit dem Biophotometer (Eppendorf) wurde darauf geachtet, dass eingesetzte Verdünnungen eine optische Dichte von 0,1 bis 1 aufwiesen, um im linearen Messbereich des Gerätes zu liegen. Proben, die mit dem *Nanodrop ND-1000* Spektralphotometer gemessen wurden, mussten nicht verdünnt werden. Die Konzentrationen von Proben, die in anschließenden Versuchen miteinander verglichen werden sollten, wurden immer mit demselben Photometer gemessen.

Die isolierte RNA wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Langzeitlagerung erfolgte bei -80 °C nach Zugabe von 2 Vol. Ethanol abs. Zur Fällung und anschließenden Verwendung dieser RNA wurde 1/35 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,5; entspricht 1/10 Vol. der Ausgangs-RNA-Lösung) hinzugegeben. Der weitere Ablauf entsprach dem Vorgehen einer Fällung (vgl. 2.1.7). Es wurden im Laufe der gesamten Arbeit zwar verschiedene Isolierungsmethoden verwendet, jedoch wurden für vergleichende (Genexpressions-) Analysen immer RNA-Proben benutzt, die mit der gleichen Isolierungsmethode aufgearbeitet wurden.

Der Umgang mit RNA erforderte, dass alle Laborhilfsmittel sowie Reaktionsgefäße frei von RNasen waren. Dies wurde zum einen gewährleistet durch die Verwendung von Lösungen und Puffern, die mit Diethyl-Pyrocyanat- (DEPC-) behandeltem Wasser angesetzt wurden. Zum anderen wurde RNase-freie Plastikware und Filterspitzen verwendet, sowie Glasware, die bei 220 °C für 2 h sterilisiert wurde.

2.1.7 Fällung von RNA

Die Fällung von RNA erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,5) und 2 Vol. gekühltem Ethanol abs. Nach Vortexen wurde die RNA bei 16.000 bis 21.000 g für mindestens 45 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA wurde durch Zugabe von 75 %igem Ethanol und anschließender Zentrifugation für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Nach leichter Trocknung in einer Vakuum-Zentrifuge (Eppendorf-Concentrator) bei Raumtemperatur wurde die RNA in hochreinem RNase-freiem Wasser (Qiagen, Promega) gelöst.

2.1.8 DNase-Behandlung von Gesamt-RNA

Da nicht alle Gesamt-RNA-Extraktionsmethoden einen DNase-Verdau vorsehen, wurde dieser im Anschluss an die RNA-Isolierung in einem zusätzlichen Schritt durchgeführt. Es

wurde die RNase-freie DNase von Fermentas verwendet. Dazu wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA in einem 10 µl-Volumen behandelt. Bei größeren RNA-Mengen wurde der Ansatz linear vergrößert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 25 nmol EDTA und anschließender Inkubation bei 65 °C. Die Konzentration und Reinheit der Proben wurde erneut bestimmt (vgl. 2.1.6).

2.1.9 Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA

Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese wurden 500 ng bis 1 µg DNase-behandelte Gesamt-RNA verwendet, die in RNase-freiem Wasser gelöst vorlag. Für die reverse Transkription mit *SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase* (Invitrogen) wurde ein „Oligo (dT)₁₈“ Primer (500 ng) verwendet. Bei der Durchführung von vergleichenden Genexpressions-Analysen wurden immer exakt gleiche Mengen an Gesamt-RNA revers transkribiert (überprüft durch optische Dichte-Messung bei 260 nm) und nach Möglichkeit alle Proben gleichzeitig angesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers, ohne Zugabe von RNaseOUT.

2.1.10 Sequenzierung von Plasmidvektoren bzw. PCR-Produkten

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode. Als DNA-Matrize wurden entweder PCR-Produkte eingesetzt, die auf einem Agarosegel nur eine eindeutige Bande zeigten oder Plasmidvektoren, wie z. B. *pGEM®-T Easy* (Promega). PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierungsreaktion mit Hilfe des *E.Z.N.A. Cycle Pure Kit* (PeqLab) aufgereinigt und Plasmid-DNA durch den *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit* (PeqLab) isoliert. Um nachfolgende Sequenzierungsreaktionen durch EDTA nicht zu stören, wurde bei beiden Systemen die DNA mit 50 µl HPLC-Wasser von der Silica-Säule heruntergelöst und nicht mit TE-Puffer, wie in der Anleitung des Herstellers angegeben. Es wurden für eine Sequenzierungsreaktion 20-100 ng DNA eines PCR-Produktes oder 200-500 ng Plasmid-DNA in 10 µl-Sequenzierungsansätzen verwendet. Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte unter Zuhilfenahme eines der beiden PCR-Primer. Plasmid-Vektoren wurden mit Standard-Primern sequenziert, z. B. mit SP6- und T7-Primern im Fall des Vektors *pGEM®-T Easy* (Promega). Eingesetzt wurden 10 pmol des Primers, 2 µl 5 x *Big Dye*-Reaktionspuffer und 1 µl *BigDye Premix Version 3.1* des *ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems).

MATERIAL UND METHODEN

Folgendes Zwei-Stufen-Protokoll wurde durchgeführt: 15 s 94 °C Denaturierung, 4 min 55 °C Primeranlagerung und Elongation in 33 Zyklen. Die Sequenzierungsprodukte wurden durch Zugabe von 1 µl 0,22 % SDS, sowie Erhitzen auf 96 °C für 5 min und anschließendem Inkubieren für 10 min bei 25 °C denaturiert. Die Auftrennung der Sequenzierungsprodukte erfolgte auf Kapillarsequenzierautomaten des Typs *ABI PRISMTM 3730* (Applied Biosystems) der Firma GENterprise Genomics.

2.1.11 Auswertung von Sequenzdaten

Die computergestützte Auswertung von Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der *Chromas 1.45* Software (Technylesium) und der *Lasergene Sequence Analysis Software 5.08* (DNASTAR). Um Einzelsequenzen zu assemblieren, wurde die *Lasergene* Programmfunktion *SeqMan II* verwendet. Mit den erhaltenen Sequenzdaten wurden über das Internet Blast-Datenbanksuchen am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul et al. 1990). Dazu wurden abhängig von der Anwendung verschiedene Suchalgorithmen verwendet und unterschiedliche Datenbanken durchsucht.

2.2 Bestimmung der Transkriptionsstart- und -endpunkte durch „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE)

Zur Aufklärung der Sequenz der 5' und 3' Bereiche von cDNAs wurden 5'RACE (vgl. 2.2.1) und 3'RACE (vgl. 2.2.2) Reaktionen mit dem *5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen) eingesetzt. Für die Durchführung der 3'RACE wurde ein zusätzlicher Primer verwendet, der im Kit nicht vorhanden war (*3'RACE-AP*). Die für die RACE-Reaktionen verwendete Taq-Polymerase war die *Accuprime Taq DNA-Polymerase* von Invitrogen. Für schwierige Fälle, in denen die Reaktion kein Ergebnis brachte, wurde der *GeneRacer Kit* (Invitrogen) benutzt, der nur Vollängentranskripte amplifizieren sollte.

2.2.1 Ermittlung des Transkriptionsstarts durch 5'RACE

Der 5' untranslatierte Bereich (5'UTR) von Genen wurde mit Hilfe der 5'RACE-Reaktion bestimmt, ausgehend von 2,5 µg Gesamt-RNA und drei genspezifischen Primern, die aus der vorhandenen kodierenden Sequenz ausgewählt wurden. Der erste genspezifische Primer

diente zur cDNA-Erststrang-Synthese. Es wurde das Standardprotokoll verwendet, welches mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase das Anhängen eines oligo(dC)-Schwanzes an das 3'Ende der einzelsträngigen cDNA vorsieht (*5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0*, Invitrogen). Die erste PCR wurde mit einem genspezifischen Primer durchgeführt, der nicht dem Primer für die cDNA-Synthese entsprach, in Kombination mit dem mitgelieferten *Abridged Anchor Primer (AAP)*. Die anschließend durchgeführte *nested* PCR erfolgte mit einem zusätzlichen, im ersten Amplikon weiter innen liegenden, genspezifischen Primer sowie dem *Abridged Universal Amplification Primer (AUAP)*. Sind nach dieser *nested* PCR mehrere Banden entstanden, wurde die letzte PCR mit erhöhter Primerbindungstemperatur wiederholt bzw. dieses PCR-Produkt mit Hilfe des *pGEM®-T Easy* (Promega) Plasmidvektors kloniert (vgl. 2.1.5) und die Klone sequenziert (vgl. 2.1.10).

2.2.2 Ermittlung des Transkriptionsendes durch 3'RACE

Die 3'RACE Reaktion wurde mit 2,5 µg Gesamt-RNA entsprechend dem Protokoll *3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen) durchgeführt. Die Erststrangsynthese erfolgte mit einem Primer, der einen zum Poly-A Ende komplementären dT-Anteil als auch eine spezifische Sequenz besaß (*Adapter Primer AP*, Invitrogen). Lieferte die anschließende PCR mit einem genspezifischen Primer und einem Primer, der dem spezifischen Teil des *AP* Primers entsprach (*AUAP*), nur eine definierte Bande, wurde dieses PCR-Produkt aufgereinigt und „direkt“ sequenziert (vgl. 2.1.10). Falls mehrere Produkte entstanden, wurde eine *nested* PCR mit einem weiter im 3'Bereich der mRNA liegenden Primer und dem Primer der ersten PCR durchgeführt. Entstanden mehrere Banden, die durch Erhöhung der Primerbindungstemperaturen nicht verschwanden, so erfolgte eine Klonierung dieses PCR-Ansatzes in das *pGEM-T Easy* (Promega) Vektorsystem (vgl. 2.1.5) mit anschließender Sequenzierung (vgl. 2.1.10).

2.2.3 Ermittlung von Vollängentranskripten mit dem GeneRacer Kit

Der *GeneRacer Kit* wurde exakt nach den Angaben des Herstellers benutzt, ausgehend von 2,5 µg Gesamt-RNA. Es wurde zusätzlich das *Superscript III Modul* (Invitrogen) in Verbindung mit dem *Generacer oligo (dT) Primer* verwendet. Die verschiedenen PCRs wurden durchgeführt mit der *Accuprime Taq-DNA-Polymerase* und dem Puffersystem I

(Invitrogen). PCR-Produkte wurden bei Vorhandensein einer einzigen Bande „direkt“ sequenziert, ansonsten in *pGEM-T Easy* (Promega) kloniert und sequenziert.

2.3 „Genome-Walking“ zur Ermittlung von Genomsequenz-Bereichen

Um einen Teil der genomischen Promotersequenz zu erhalten, wurde *Genome Walking* bzw. *Ligation Mediated PCR* nach Luft et al. (2001) durchgeführt. Hierzu wurde genomische DNA mit den Restriktionendonukleasen Bgl II (A↓GATCT) und Bcl I (T↓GATCA) nach Angaben des Herstellers einzel- und doppelverdaut. An diese DNA-Fragmente (jeweils 600 ng) wurde der Adapter AS1/AL1 (50 pmol) über 5′GATC-überhängende Enden ligiert. Zur Herstellung dieses Adapters wurden die beiden Oligonukleotide AS 1 und AL 1 zuvor in äquimolaren Mengen in 66 mM Tris / HCl, pH 7,4 vermischt, auf 90 °C für 2 min erhitzt und ü. N. in einem Wasserbad langsam auf 4 °C abgekühlt. Der Adapter wurde aliquotiert bei -20 °C gelagert, und kurz vor Verwendung bei 4 °C aufgetaut. Zur Ligation des Adapters wurde eine T4-DNA-Ligase (1 U/μl, Fermentas) in einem 15 μl-Ansatz verwendet. Danach wurde der Ansatz mit HPLC-Wasser auf 15 ng/μl DNA verdünnt. Die PCR-Amplifikation erfolgte in einem 25 μl Gesamtvolumen. In der ersten „PCR“ wurde eine lineare Amplifikation der DNA mit nur einem genspezifischen Primer (10 pmol) durchgeführt, der aus der bereits bekannten 5′UTR Sequenz ausgewählt wurde. Diese erfolgte nach einem Standard-PCR-Protokoll (vgl. 2.1.4). Für die anschließende zweite PCR wurden 2 μl des PCR-Produktes aus der linearen Amplifikation benutzt. Dazu wurde ein weiterer genspezifischer Primer (10 pmol) und ein Primer verwendet, der an den ligierten Adapter binden sollte (AP1, 10 pmol). Das Ergebnis dieser PCR wurde auf einem Agarosegel getestet und bei Vorhandensein einer spezifischen Bande nach Aufreinigung durch das *E.Z.N.A. Cycle Pure Kits* (PeqLab) sequenziert (vgl. 2.1.10).

2.4 Genomische Sequenzvergleiche und Berechnungen der Evolutionsraten

Es wurden BLASTN Datenbank-Suchen am NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) durchgeführt (Altschul et al. 1990), um orthologe Nukleotid-Sequenzbereiche von eigens sequenzierter DNA und in der Datenbank vorhandenen Sequenzen zu identifizieren. Mit Hilfe der Software *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org/>) wurde nach repetitiven Sequenzen unter Verwendung der Einstellungen „höchste Empfindlichkeit“ sowie „langsame Geschwindigkeit“ gesucht. Als Ausgangs-DNA wurde „Nagetier“ eingestellt. Zur Erstellung von Prozent-Identitäts-Plots und zur Kenntlichmachung von

Sequenzkonservierung auf der genomischen Ebene wurden diese erhaltenen Daten in das Programm *MultiPipMaker* eingegeben (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>; Schwartz et al. 2000). Die Berechnung von Nukleotid-Substitutionsraten in kodierenden Bereichen wurde für synonyme und nicht-synonyme Stellen getrennt durchgeführt und für multiple Treffer korrigiert, wie von Nei und Gojobori (1986) beschrieben. Codon-alignierte Nukleotid-Sequenzen orthologer Gene mehrerer Spezies wurden hierzu in der *SNAP*-Software verwendet (<http://www.hiv.lanl.gov>), entsprechend der Vorgaben auf der Internetseite. Weitere Berechnungen von Evolutionsraten wurden mit Hilfe des *BioEdit Sequence Alignment Editors 7.0.5.3* (Hall 1999) durchgeführt. Für vergleichende Promotor-Analysen wurden *PipMaker BlastZ* Sequenzvergleiche (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>; Schwartz et al. 2000) erstellt. Die Auswertung und grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programmes *GenePalette* (Rebeiz und Posakony 2004). Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die in die hypoxievermittelte Genregulation einbezogen sind, wurden gemäß der Regeln in Wystub et al. (2004) und der darin enthaltenen Referenzen gesucht. Verwendet wurden die in Tabelle 4-1 enthaltenen Sequenzmotive. Um potenziell kodierende, konservierte Intronsequenzen auf offene Leserahmen zu untersuchen, wurde der *Open Reading Frame Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) verwendet. Die Genom-Sequenzen wurden unter Verwendung von *SMARTest* (Rollini et al. 1999) auf potenzielle Matrix-assoziierte Regionen untersucht.

Die Untersuchung der Gensequenzen auf das Vorkommen von „*neuron restricted sequence elements*“ erfolgte mit Hilfe des Programms *MSCAN* nach den Angaben auf der Homepage (<http://tfscan.cgb.ki.se/cgi-bin/MSCAN>) und entsprechend der Vorgaben in Laufs et al. (2004).

2.5 Quantitative realtime RT-PCR

Das Prinzip der qRT-PCR beruht auf der hochspezifischen Detektion von PCR-Produkten während ihrer Entstehung (in „real-time“). Die für qRT-PCR geeigneten Thermocycler sind mit einer optischen Auswerteeinheit gekoppelt, die es erlaubt, die PCR-Produkte über Fluoreszenz sehr genau zu quantifizieren. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Endpunktdetektion einer herkömmlichen PCR liegt darin, dass die Produkte in ihrer exponentiellen Wachstumsphase quantifiziert werden. Je stärker ein Gen in einer bestimmten Probe exprimiert wird und je mehr Matrizenmoleküle demzufolge in die PCR eingesetzt werden, desto früher entsteht im Ansatz eine nachweisbare Menge an Produkt. Schon zwei bis

drei Zyklen, nachdem die Fluoreszenz zum ersten Mal nachweisbar ist, wird üblicherweise die Quantifizierung vorgenommen. Betrachtet man hingegen das PCR-Ergebnis erst nach 35 oder 40 Zyklen auf einem Agarosegel, wie es bei einer konventionellen PCR üblich ist, so kann man keine exakten quantitativen Aussagen über die am Anfang eingesetzte Matrizenmenge machen.

2.5.1 Verwendete Detektionsmethoden

Man unterscheidet bei der quantitativen PCR zwei grundlegend unterschiedliche Prinzipien, nach denen das entstandene PCR-Produkt detektiert werden kann: Die TaqMan[®]- und die SYBR-Green[®] Methode. Beide Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit von mir verwendet.

2.5.1.1 TaqMan[®]-Methode

Die TaqMan-Methode beruht auf dem Prinzip des fluorogenen 5'-Nuklease Assays (Livak et al. 1995; Abbildung 2-1). Hierzu benötigt man zwei Standard PCR-Primer, die ein Produkt von ca. 80-120 Bp erzeugen und zusätzlich eine zwischen diesen Primern liegende fluorogene TaqMan-Sonde, die spezifisch an das Amplifikat der zu untersuchenden DNA hybridisieren kann. Dabei ist es egal, auf welchem Strang die Sonde liegt. Sie sollte eine Länge von 15-30 Nt haben. An ihrem 5'-Ende besitzt die Sonde einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z. B. 6-FAM oder VIC), am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff. Wird der Reporter-Farbstoff einer intakten Sonde durch Licht zur Fluoreszenz angeregt, so erfolgt ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) hin zum Quencher, der sich in räumlicher Nähe befindet. Dieser Quencher ist entweder ebenfalls fluoreszierend (z. B. TAMRA) oder er gibt im Fall eines sog. *Dark-* oder *Black-Hole-Quenchers* seine Energie als Wärme ab. Dieses Quenching erfolgt sowohl bei einzelsträngigen, ungebundenen sowie an die Zielsequenz angelagerten Sonden. Nachdem sich in einer PCR die Primer und die Sonde an die Zielsequenz angelagert haben und die Taq-Polymerase mit der Strangverlängerung beginnt, wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die gerade angelagerte Sonde abgebaut. Das hat zur Folge, dass Reporter und Quencher voneinander getrennt werden, es somit keinen FRET mehr geben kann und der Reporter seine Energie als Licht emittiert. Wenn genügend Sondenmoleküle abgebaut werden, misst der Thermocycler die entstehende Fluoreszenz. In jedem Zyklus entsteht solange mehr Fluoreszenz, bis die Plateauphase erreicht ist. Ein Vorteil dieser Methode ist die mögliche Verwendung verschieden markierter Sonden in einem PCR-

Ansatz zur gleichzeitigen Detektion verschiedener Gene, wie z. B. eines Zielgens und eines Referenzgens. Die Durchführung dieser Multiplex-PCR erfordert umfangreiche Optimierungsschritte, die v.a. bei diagnostischen Untersuchungen eine Vereinfachung darstellen und sich deshalb auszahlen.

2.5.1.2 SYBR-Green-Methode

Für die SYBR-Green Methode benötigt man zum Nachweis entstehender Amplifikate keine teure, genspezifische Sonde, sondern nur den unspezifisch an DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Abbildung 2-2). Ungebundenes SYBR Green fluoresziert nicht. Je mehr doppelsträngige PCR-Produkte entstehen, umso mehr kann sich SYBR-Green an diese Doppelstränge anlagern. Man benötigt für diese Methode Primer, die optimalerweise eine Produktgröße von 150-200 Bp erzeugen. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass man keine teure TaqMan-Sonde benötigt, sondern lediglich Primer, die ein hochspezifisches Produkt generieren. Das ist jedoch gerade das größte Problem dieser Methode. Sollten bei der PCR zusätzlich zum eigentlichen Amplifikat ein oder mehrere unspezifische Produkte entstehen, so lagert sich das SYBR Green auch in diese Produkte ein und verfälscht das Ergebnis bzw. macht es unbrauchbar. Das gleiche gilt für eventuell entstehende Primer-Dimere, die zwar einen geringen Schmelzpunkt haben, jedoch bei der üblichen Detektionstemperatur von 72 °C zumeist noch nicht geschmolzen sind. Es muss daher eine Optimierung der Primersequenz bzw. der Primerkonzentration erfolgen. Die Überprüfung der PCR auf Spezifität erfolgt durch Anschließern einer Schmelzkurve an die qRT-PCR, die ebenfalls im Thermocycler durchgeführt wird. Hierbei wird nach dem eigentlichen PCR-Lauf die Abnahme der Fluoreszenz bei Erhöhung der Temperatur von 60 °C auf 95 °C bestimmt. Ein spezifisches Produkt ergibt dabei einen einzigen schmalen Peak bei einer bestimmten Temperatur. Das Vorhandensein verschiedener Produkte kann man an mehreren Peaks bei verschiedenen Temperaturen erkennen. Ein Agarosegel zur Überprüfung des erwarteten Produktes gibt zusätzliche Sicherheit. Sollte es nicht möglich sein, Primer-Dimere zu eliminieren, ist es mit einem 4-Schritt-Cycling-Protokoll möglich, die Entstehung dieser Produkte zwar nicht zu unterbinden, jedoch deren Detektion zu umgehen. Dazu fügt man einem aus 3 Schritten bestehenden Standard-PCR-Protokoll einen zusätzlichen Detektionsschritt hinzu. Die Temperatur in diesem Schritt muss so hoch liegen, dass Primer-Dimere komplett geschmolzen vorliegen, das spezifische Produkt jedoch noch nicht. Die optimale Detektionstemperatur liegt bei etwa 3 °C unter dem Peak der spezifischen Produkte. Hierzu bleibt anzumerken, dass es ungeachtet dieses Tricks weiterhin zu versuchen gilt, die

Entstehung von Primer-Dimeren zu umgehen (z. B. durch Erhöhung der Primerbindungstemperatur), da diese Produkte die Effizienz der spezifischen PCR negativ beeinflussen können.

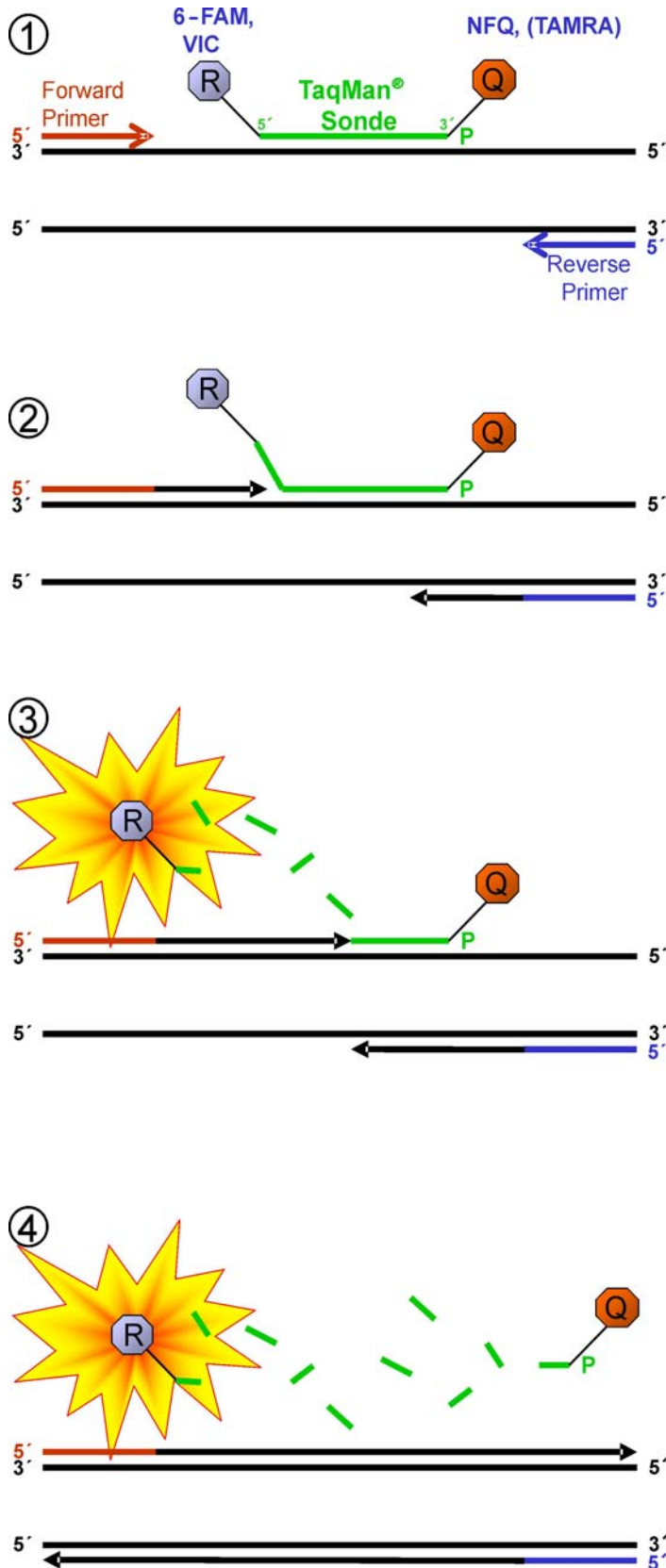


Abbildung 2-1: Prinzip des fluorogenen TaqMan Assays nach Livak et al. 1995. (1) Anlagerung von *Forward* und *Reverse* Primer sowie der TaqMan-Sonde, die 15-30 Nt lang ist. Die Sonde besteht aus einem Reporterfarbstoff (z. B. 6-FAM oder VIC) an ihrem 5'-Ende und einem Quencherfarbstoff (z. B. TAMRA) oder ein *Non-fluorescent Quencher NFQ* am 3'-Ende. Die intakte, gebundene oder ungebundene Sonde absorbiert über den Reporterfarbstoff Licht und gibt diese Energie durch seine räumliche Nähe an den Quencherfarbstoff weiter. Dieser Energietransfer passiert mittels *FRET* (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), wodurch die Energie in längerwelliges Licht (TAMRA) umgewandelt oder als Wärme (*NFQ*) abgegeben wird. (2) Durch das Entlanglaufen der *Taq*-Polymerase an dem Strang, an dem auch die Sonde gebunden ist, kommt es zur Anhebung der Sonde und im Schritt (3) zum Zerschneiden der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase, bis zum kompletten Abbau der Sonde (4). Dadurch ist eine Nähe zwischen Reporter- und Quencherfarbstoff nicht mehr gegeben und es kommt zur Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs. Bei fortlaufender PCR werden immer mehr Sondenmoleküle abgebaut, wodurch ab einer bestimmten Produktmenge bzw. Menge an abgebauter Sonde die Fluoreszenz durch den Realtime-PCR Thermocycler detektiert werden kann. Je mehr Kopien eines Gens also am Anfang einer PCR vorliegen, desto früher im Laufe der PCR wird das Gen in der untersuchten Probe hochspezifisch detektiert. Möglicherweise entstandene Primer-Dimere werden bei dieser Methode nicht detektiert.

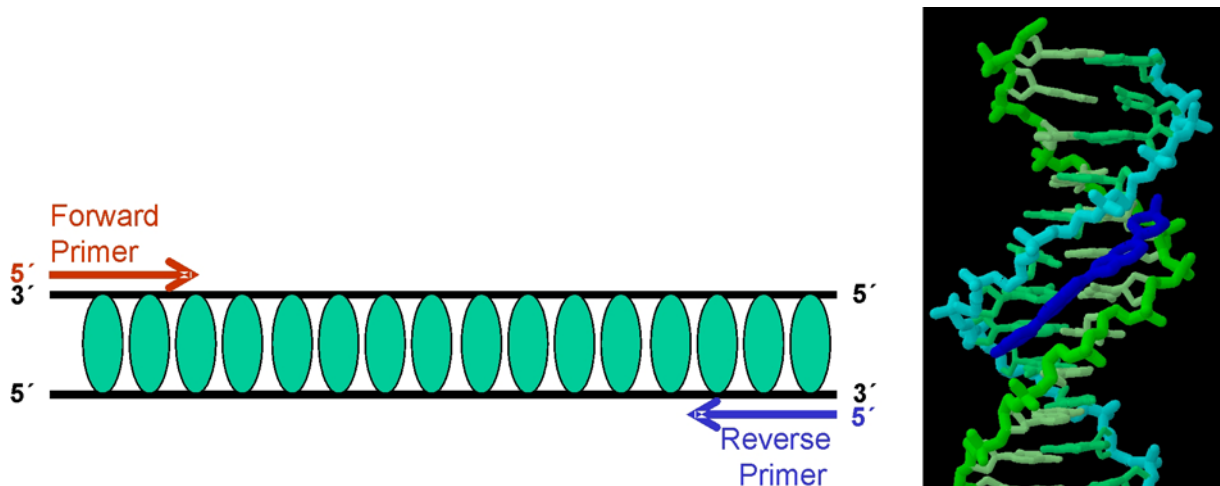


Abbildung 2-2: Prinzip der Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green in entstehende PCR-Produkte. Zu Beginn einer Realtime-PCR liegen nur wenige doppelsträngige DNA-Moleküle vor, in deren kleine Grube sich das SYBR Green einlagert. Diese Fluoreszenz reicht nicht aus, um von dem Thermocycler detektiert zu werden. Ungebundenes SYBR Green fluoresziert nicht. Je mehr Produkte im Laufe der PCR entstehen, umso mehr SYBR Green Fluoreszenz wird detektiert. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass auch möglicherweise entstandene, unspezifisch amplifizierte Produkte oder Primer-Dimere, die auf nicht optimales Primerdesign zurückzuführen sind, detektiert werden. Diese eventuellen Nebenprodukte können mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse identifiziert werden.

Neben diesen beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Prinzipien bieten verschiedene Hersteller weitere Fluoreszenzsysteme an, die jedoch in diesem Zusammenhang nicht erklärt werden (z. B. *Molecular Beacon Probes*, *LNA Double-Dye Oligonucleotide Probes* oder *Scorpions[®] Primers*), da sie in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet wurden.

2.5.2 Auswertung von qRT-PCR-Daten

Die wichtigste grafische Darstellung des Ergebnisses einer Realtime-PCR ist der Amplifikationsplot (Abbildung 2-3). In dieser Darstellung legt man das Hintergrundrauschen durch die *Baseline*, sowie die Stärke des Fluoreszenzsignals fest, bei dem alle Proben gemessen werden (*Threshold* oder Schwellenwert). Der Ct-Wert einer Probe beschreibt den Zyklus, bei dem der Schwellenwert durchschritten wird.



Abbildung 2-3: Amplifikationsplot einer seriellen 10fach Verdünnungsreihe von Plasmiden (Standardreihe von 10^8 bis 10^4 Kopien). Aufgetragen ist die Zyklennummer gegen das mit ROX normalisierte (s. u. *Durchführung der qRT-PCR.-2*) Fluoreszenzsignal. Die *Baseline* legt das Hintergrundrauschen des Fluoreszenzsignals fest, der *Threshold* (Schwellenwert) die Stärke des (normalisierten) Fluoreszenzsignals, bei dem gemessen wird. Der Ct-Wert (Cycle of threshold) einer Probe ist definiert als der Zyklus, in dem der Schwellenwert durchschritten wird.

Die Effizienz der PCR ist ein Maß für die Güte des verwendeten Assays, sprich der Primer-Sonden-Kombination (TaqMan-Assay) oder der Primer-Kombination (SYBR-Green Assay). Von 100 %iger Effizienz spricht man, wenn es pro PCR-Zyklus eine Verdopplung des entstehenden Produktes gibt. Diese Effizienz berechnet man anhand der so genannten Standardgeraden. Zum Erstellen dieser Geraden benötigt man Standardproben, deren Kopienzahl man genau kennt. Es handelt sich dabei zumeist um Plasmide, deren Länge und Konzentration bekannt ist, worüber man die Kopienzahl sehr genau bestimmen kann. Von diesem Plasmid werden serielle 10-fach Verdünnungen in der qRT-PCR eingesetzt. Anhand der erstellten Standardgeraden (Abbildung 2-4) lassen sich direkt die in den untersuchten Proben vorhandenen Kopienzahlen errechnen. Anhand des Ct-Wertes der einzelnen PCR-Reaktionen berechnet das Programm die absoluten Kopienzahlen einer jeden Probe. Die erhaltene PCR-Effizienz E berechnet sich aus der folgenden Formel, wobei m die Steigung (engl. *slope*) der Standardgeraden ist:

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

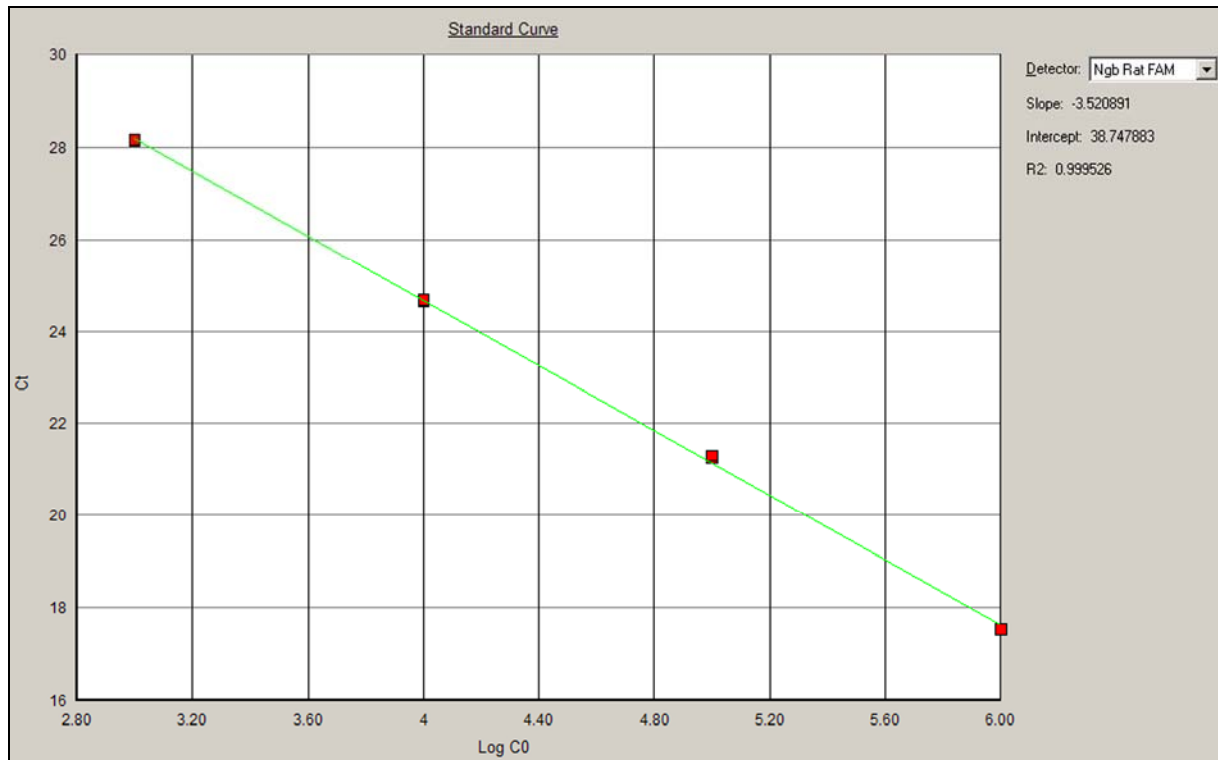


Abbildung 2-4: Die Standardgerade wird dazu benötigt, Kopienzahlen der untersuchten Proben zu bestimmen. Sie wird erstellt z. B. aus seriellen zehnfach Verdünnungen von Plasmiden bekannter Konzentration, die die zu amplifizierende Sequenz enthalten. Aufgetragen ist der Logarithmus zur Basis 10 der Anfangs-Kopienzahl gegen den Ct-Wert der einzelnen Standardproben. Die Standardgerade ist die Regressionsgerade durch die einzelnen Punkte. Eigentlich handelt es sich bei der Standardgeraden um eine Kurve, wie auch schon der englische Name vermuten lässt. Da wir jedoch nicht die Kopienzahlen, sondern den Logarithmus der Kopienzahlen im Diagramm auftragen, erhalten wir keine Kurve, sondern eine Gerade. *Slope* beschreibt die Steigung dieser Geraden. Sie kann verwendet werden zur Berechnung der *Assay-Effizienz*. Der Wert *Intercept* gibt den Ct-Wert an, bei dem theoretisch eine einzige Kopie pro PCR-Ansatz detektiert werden würde. R^2 ist das Quadrat des Korrelationskoeffizienten und gilt hier als Maß für die Pipettiergenauigkeit der Standardverdünnungen.

Geht es nicht um eine absolute Quantifizierung der Proben, sondern um relative Quantifizierung, so bedient man sich häufig der cDNA-Verdünnung. Dazu werden cDNAs seriell 5-fach verdünnt. Da man Kopienzahlen in cDNAs nicht kennt, werden fiktive Zahlen entsprechend der 5-fachen Verdünnung angegeben. Bei dieser Art der relativen Quantifizierung kann man also keine Aussagen über die tatsächlichen Kopienzahlen in der Probe machen, sondern lediglich über Expressionsunterschiede in verschiedenen Proben. Zum Vergleich der Expressionsstärke zweier Gene in einem Gewebe genügt eine solche Standardgerade also nicht, man benötigt Standardgeraden mit genauen Angaben zu den Kopienzahlen.

MATERIAL UND METHODEN

Möchte man zwei Gewebeproben auf ihre Expression hin miteinander vergleichen, so benötigt man Methoden zur Normalisierung. Das heißt, man muss dafür Sorge tragen, dass die Proben vergleichbar sind. Dieses Angleichen der Proben beginnt schon damit, dass man versucht, beim Vergleich von Gehirnbereichen korrespondierende Regionen aus zwei Individuen zu dissektieren. Die RNA-Präparation aller zu vergleichender Proben sollte unter exakt gleichen Bedingungen ablaufen. Da es bei der RNA-Extraktion unweigerlich zu unterschiedlichen Konzentrationen kommt, müssen im nächsten Schritt die RNA-Mengen angeglichen werden. Dies geschieht über optische Dichte-Messungen. Dabei werden bei 260 nm zu einem Großteil (>95 %) ribosomale RNAs gemessen. Werden für den folgenden Schritt der DNase-Behandlung also gleiche Mengen Gesamt-RNA eingesetzt, so ergibt sich ein weiterer Normalisierungsschritt. Nach dieser DNase-Behandlung werden gleiche Mengen an Gesamt-RNA für die reverse Transkription eingesetzt. Dieser Schritt ist im gesamten Ablauf der kritischste, da die Effizienz der reversen Transkriptase stark variieren kann. Ein weiteres Problem besteht darin, dass es auf Ebene der cDNA, die für qRT-PCR-Versuche eingesetzt wird, keine akzeptierte Vorgehensweise der Normalisierung gibt. Ein Versuch, eine Methode zur cDNA-Quantifizierung zu etablieren, wurde in der vorliegenden Arbeit unternommen (vgl. 2.6). Die bekannteste Methode der Normalisierung auf Ebene der Transkription ist die Verwendung von Referenzgenen, also solchen Genen, die in allen untersuchten Geweben gleich stark exprimiert werden. Man beachte die Abgrenzung zum Begriff des Haushaltgens, der lediglich Auskunft darüber gibt, dass das Gen in unterschiedlichen Proben vorhanden ist. Es gibt eine sehr große Anzahl an Publikationen, die ihre Realtime-PCR-Daten auf ein beliebiges Haushaltsgen beziehen, allen voran *Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase* (GAPDH), ohne die stabile Expression dieses potenziellen Referenzgens vorher getestet zu haben. GAPDH hat verschiedenste Funktionen, z. B. bei Membrantransport und -fusion, Aufbau von Mikotubuli und nukleärem RNA-Export. Weiterhin dient GAPDH als Protein-Phosphotransferase, hat Kinaseaktivität, kontrolliert die Transkription und spielt eine Rolle bei der DNA-Replikation sowie der DNA-Reparatur (Review-Artikel von Sirover 1999).

2.5.2.1 Berechnung der differentiellen Genexpression mittels verschiedener Auswertemethoden ohne und mit Verwendung von Referenzgenen.

- a. Berechnung ohne Verwendung von Referenzgenen.** Diese hier vorgestellte Auswertemethode ist in ihrer Berechnung die einfachste und kostengünstigste. Mit

MATERIAL UND METHODEN

dem Messen der RNA-Konzentration vor der reversen Transkription und dem Angleichen der Mengen an eine definierte Menge an Gesamt-RNA führt man annähernd eine Normalisierung auf den rRNA-Gehalt der Proben durch. Da die mit Hilfe kommerzieller Kits erhaltene RNA zu über 95 % aus rRNA besteht (u.a. durch Wegfall kleiner RNA-Moleküle, wie tRNAs oder 5,8 S rRNAs), wird durch optische Dichte-Messungen bei 260 nm v. a. rRNA detektiert. Neben der Einfachheit der Methode hat sie einen weiteren großen Vorteil: Ungenauigkeiten, die z. T. durch erheblich regulierte Referenzgene entstehen können, werden hiermit ausgeschlossen. Unumgänglich ist diese Methode, wenn man keine Referenzgene findet (Bustin 2002). Dies ist z. B. für einen Vergleich der Genexpression zwischen verschiedenen Spezies der Fall. Skeptiker dieser Methode bemängeln jedoch, dass Unterschiede in der Effizienz der reversen Transkription zu falschen Ergebnissen führen können. Die Effizienz sowohl der reversen Transkription als auch der anschließenden PCR kann dadurch beeinträchtigt werden, dass z. B. unterschiedliche Mengen an Inhibitoren vorliegen könnten, wie bei einigen Extraktionsmethoden möglicherweise Phenolreste. Bereitet man alle Proben parallel auf, so kann man die Unterschiede gering halten, was für dieses Vorgehen spricht. Zur Berechnung der Expressionsunterschiede zweier Proben wird die Kopienzahl des zu testenden Gewebes durch die Kopienzahl des Kalibrators, also dem Vergleichs- oder Normalgewebe, dividiert.

- b. Standardkurvenmethode.** Die Standardkurvenmethode beruht auf der Berechnung von Expressionsunterschieden (relative Quantifizierung) mittels absoluter Kopienzahlen eines Gens und eines Referenzgens in einer untersuchten Probe. Diese Methode setzt voraus, dass sowohl für das Ziel- als auch für das Referenzgen Standardgeraden erstellt werden. Wenngleich es immer das Ziel sein sollte, PCR-Effizienzen nahe 100 % zu erreichen, ermöglicht diese Methode auch das Einbeziehen von Genen, die mit einer weniger optimalen Effizienz amplifiziert werden. Die Berechnung besteht aus zwei grundlegenden Schritten: Zunächst erfolgt die Normalisierung des Zielgens auf das Referenzgen durch Bildung des Quotienten der absoluten Kopienzahlen von Zielgen und Referenzgen für beide Gewebe. Anschließend wird das zu testende Gewebe auf den Kalibrator, also auf das Bezugs- oder auch Normalgewebe, bezogen. Um den Faktor zu erhalten, um den das Zielgen im Testgewebe stärker exprimiert wird als im Kalibrator, bildet man den Quotienten aus den beiden im ersten Schritt erhaltenen Quotienten von Testgewebe und

Kalibrator. Zur relativen Genexpressionsanalyse wird die Expression des Kalibrators in den meisten Fällen gleich 100 % gesetzt. Ist ein Gen im Testgewebe etwa um den Faktor 2,5 höher exprimiert, so ergibt sich dafür eine Expression von 250 %, verglichen mit dem Kalibrator.

- c. **$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.** Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode rechnet im Gegensatz zur Standardkurvenmethode nicht mit absoluten Kopienzahlen, sondern mit Ct-Werten (Livak und Schmittgen 2001). Man kann mit dieser Methode also keine absolute Quantifizierung durchführen, sondern lediglich relative Aussagen treffen, was meist das Ziel von Genexpressionsuntersuchungen ist. Ein Problem dieser Methode ist, dass die Effizienzen von Ziel- und Referenzgenen sich gleichen müssen (Unterschied in Steigung $< 0,1$). Die Berechnung der differentiellen Genexpression erfolgt in drei Schritten: Zuerst wird die Differenz aus Zielgenen und Referenzgenen sowohl für das Testgewebe als auch für den Kalibrator gebildet (ΔCt). Im nächsten Schritt wird die Differenz aus ΔCt des Testgewebes minus dem ΔCt des Kalibrators berechnet. Das ergibt den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert. Anschließend wird die Expression im Testgewebe Exp_T mit der nachstehenden Formel (E =Effizienz, s.o.) berechnet:

$$Exp_T = (1 + E)^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

- d. **Auswertung der Genexpression mit Hilfe der Software qBase (Ver 1.3.4).** Dieses Programm basiert auf der oben beschriebenen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Unter den vorgestellten Methoden erlaubt dieses Programm, mehrere Referenzgene in die Expression des Zielgens einzubeziehen (Vandesompele et al. 2002). Dadurch sollen Fehler ausgeschlossen werden, die entstehen können, wenn ein einzelnes potenzielles Referenzgen doch reguliert ist. Bei der Auswahl mehrerer Referenzgene muss man jedoch beachten, dass diese nicht aus dem gleichen Stoffwechselweg stammen und somit unter den untersuchten Bedingungen gleichartig exprimiert werden.

2.5.3 Durchführung der qRT-PCR.

- a. Es wurde für ein Vergleichsexperiment immer die gleiche RNA-Isolierungsmethode gewählt (vgl. 2.1.6). Für die reverse Transkription wurde immer exakt 1 μg DNase-verdaute Gesamt-RNA eingesetzt (vgl. 2.1.9). Die Konzentration der RNA wurde mit

MATERIAL UND METHODEN

dem *Nanodrop ND-1000* Spektrophotometer (PeqLab) gemessen. Zur Qualitätskontrolle der Spektrometrie wurde folgendes Messschema eingeführt: Die Proben, die drei Mal unabhängig voneinander pipettiert wurden, wurden jeweils fünf Mal hintereinander gemessen. Dabei durfte die Standardabweichung aller Messwerte 5 % nicht übersteigen. Für Proben, deren Gesamt-RNA-Menge weniger als 1 µg betrug, wurden jeweils 500 ng RNA für die cDNA-Synthese verwendet. Für alle zu vergleichenden Proben wurden in diesem Fall die exakt gleiche Menge RNA eingesetzt. Alle Proben eines Vergleichsexperimentes wurden parallel angesetzt und revers transkribiert.

- b. Es wurde von allen Proben entweder 2 µl der unverdünnten oder 2 µl der 1:1 verdünnten cDNA in die Realtime-PCR eingesetzt, abhängig von der Stärke des exprimierten Gens und abhängig von der verfügbaren cDNA-Menge. Alle Proben wurden auf einer Platte entweder in Duplikaten oder Triplikaten angesetzt. Für die einzelnen untersuchten Gene wurden „Über“-Mastermixe entsprechend der Angaben der Hersteller erstellt (Abbildung 2-5). Für TaqMan Assays wurde der *Quantitect Probe PCR Kit* (Qiagen) verwendet, für SYBR Green Assays der *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) bzw. *ABolute QPCR SYBR Green ROX (500nM) Mix* (ABgene). Bei allen hier aufgezählten Formaten handelt es sich um 2fach konzentrierte, vorgefertigte Mixe, die neben einer Hot-Start Taq DNA-Polymerase den PCR-Puffer, sowie dNTPs und ROX enthalten. Dieser interne Kontrollfarbstoff ROX dient dazu, Pipettierungenauigkeiten zwischen den oben erwähnten Duplikaten und Triplikaten zu korrigieren. Auf diesen passiven Fluoreszenzfarbstoff, der nicht an der eigentlichen Detektion des Reporter- oder SYBR Green-Signals teilnimmt, wird die Reporterfluoreszenz durch die Realtime-PCR-Software normalisiert. Diese 2fach vorgefertigten Mixe wurden für jedes zu untersuchende Gen in einem „übergeordneten“ Mastermix mit Primern (entsprechend einer Endkonzentration im PCR-Ansatz: 50-200 nM) und HPLC-Wasser vermischt. Im Fall der Durchführung von TaqMan Assays wurde auch die genspezifische Sonde hinzugegeben. Diese „Übermastermixe“ wurden verteilt auf „Untermastermixe“, die den einzelnen Genen oder Plasmidstandards entsprachen. Zu diesen Reaktionsgefäßen wurden dann die verschiedenen cDNAs hinzugefügt. „Untermastermixe“ wurden auf eine 96-Well-Platte verteilt. Die Ansatzgröße pro Well variierte dabei von 20 – 30 µl, in der Regel wurden 25 µl-Reaktionen verwendet. Die 96-Well-Platte wurde mit einer durchsichtigen Folie *Optical Heat Seal Covers* (Applied Biosystems) verschlossen.

MATERIAL UND METHODEN

Die Realtime-PCR wurde mit einem Gerät des Typs *ABI Prism 7000 SDS* (Applied Biosystems) und der entsprechenden Auswertesoftware durchgeführt.

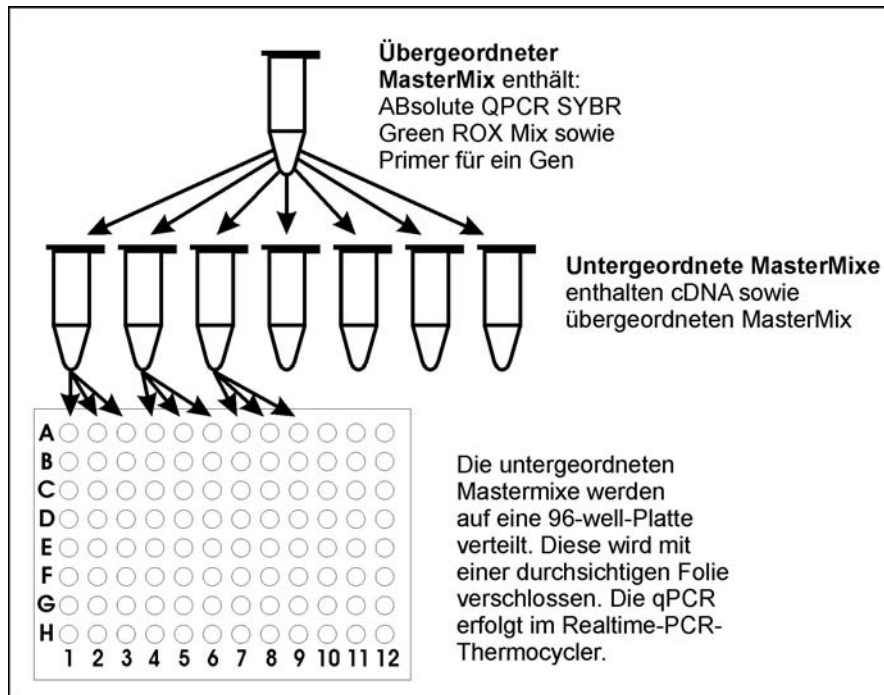


Abbildung 2-5: Pipettierschema zur Durchführung der Realtime-RT-PCR im „96-well-Format“. Zuerst wurden „übergeordnete MasterMixe“ erstellt, die, abgesehen von der Matrizen-DNA, die für eine PCR benötigten Reagenzien enthielten. Diese „übergeordneten MasterMixe“ wurden auf Reaktionsgefäße verteilt, die cDNA oder Plasmide zum Erstellen der Eichgeraden enthielten. Da alle qPCR-Reaktionen im Duplett- oder Triplet-Ansatz durchgeführt wurden, wurden diese „untergeordneten MasterMixe“ auf mehrere Reaktionsgefäße in der 96-well-Platte pipettiert.

- c. Es wurden auf jeder 96-well-Platte für jedes Gen Standardproben mitlaufen gelassen. Dazu wurden Plasmide (*pGEM T easy*, Promega) verwendet, die das jeweilige Realtime-PCR-Amplifikat enthielten. Serielle 10-fache Verdünnungen der Plasmide mit Kopienzahlen zwischen 10^8 bis 10^3 wurden eingesetzt. Die jeweilige Konzentration wurde in die Realtime-PCR-Software eingetragen, die im Anschluss an einen Lauf anhand der eingegebenen Werte die Standardgerade und somit die Kopienzahlen der einzelnen Proben berechnete.
- d. Beim Messen von Referenzgenen und Zielgenen einer Probe wurde dieselbe cDNA verwendet, um Unterschiede beim Pipettieren und unterschiedliche Effizienzen bei der reversen Transkription herauszufinden bzw. um das Referenzgen in die Expression des Zielgens mit einzuberechnen.
- e. Um eine genauere Quantifizierung zu gewährleisten, wurden teilweise mehrere Referenzgene verwendet. Die Auswertung erfolgte bei Verwendung eines einzelnen Referenzgens mittels der Standardkurvenmethode (s.o. Exkurs: Realtime-PCR), unter

Einbeziehung mehrerer Referenzgene mit dem Programm *qBase* (<http://medgen.ugent.be/qbase>; Vandesompele et al. 2002), welches auf Berechnung mittels Ct-Werten ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, s.o. Exkurs: Realtime-PCR) und nicht mittels absoluten Kopienzahlen beruht. Es wurde für jeden Versuch ein Kalibrator ausgewählt, also ein Gewebe, auf das die Expression der anderen Gewebe bezogen wurde.

2.6 *Pico-Green Fluorometermessung*

Zur relativen Quantifizierung von cDNA wurde der Farbstoff *Pico Green* (Invitrogen) verwendet. Es handelt sich dabei um einen Farbstoff, der selektiv an doppelsträngige DNA- und DNA-RNA-Hybride bindet, also cDNA. An doppelsträngige RNA-Moleküle sollte *Pico Green* laut Angaben des Herstellers nicht binden.

Die *Pico Green* Messungen wurden mit dem *TBS-380 Fluorometer* (Turner Biosystems) in Verbindung mit dem *Minicell Adaptor* durchgeführt. Es wurden Verdünnungen zum Eichwert des Gerätes sowie die zu testenden Proben angesetzt. Die Eichlösungen bestanden aus einer Leerkontrolle (TE-Puffer) sowie einem Plasmid der Konzentration 400 ng/ml. Die cDNA-Proben wurden 1:100 in TE-Puffer verdünnt. Sowohl die Eichproben als auch die zu messenden cDNAs wurden in einminütigem Abstand 1:1 mit der *Pico Green* Arbeitslösung versetzt. Nach 15minütiger Inkubation wurde zuerst das Gerät geeicht, gefolgt von der Messung der cDNAs, ebenfalls in einminütigem Abstand. Die Messung einer cDNA-Verdünnung wurde jeweils nur einmal durchgeführt, da es durch die Messung zur Abschwächung des Signals (*Photobleaching*) kam. Die erhaltenen *Pico Green* Fluoreszenzwerte wurden folgendermaßen in die Berechnung der Expressionsunterschiede zwischen Testgewebe und Kalibrator einbezogen: Nachdem der Quotient zwischen Testgewebe und Kalibrator entsprechend 2.5.2.1-Auswertemethode a (ohne Referenzgen) gebildet wurde, teilte man diesen erhaltenen Wert durch den Quotienten aus den *Pico Green* Werten von Testgewebe und Kalibrator. Damit erhielt man die auf cDNA normalisierte Expression.

2.7 *Western Blot*

Die Aufarbeitung der Proteinproben für Western-Blot-Experimente erfolgte durch Homogenisieren gesamter Gehirnhälften in Protein-Lysepuffer mit einem sterilen Teflon-

MATERIAL UND METHODEN

Glaspotter. Ein Zerkleinern der Proben im Ultraschallbad erfolgte aufgrund vorher durchgeführter Vergleichsexperimente nicht. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA Assays (Sigma-Aldrich). Es wurden zum Nachweis der Ngb-Expression exakt 135 µg, für Cygb 100 µg Protein für ein denaturierendes Polyacrylamidgel eingesetzt. Die zuvor exakt bestimmten Proteinmengen wurden mit 1/5 Vol. Protein-Probenpuffer (5 x) versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (Tabelle 2-1). Neben den eigentlichen Proben und dem Molekulargewichtstandard wurde auch das jeweilige rekombinante Protein aus Maus oder Mensch (200-500 ng) auf das Proteingel mit aufgetragen, um einen Größenvergleich zwischen Gewebeprobe und rekombinantem Protein zu erhalten. Die Elektrophorese erfolgte in einem *Mini-Protean-3 Gelsystem* (Biorad) bei 10-15 mA. Es wurde ein 14 %iges Trenngel in Verbindung mit einem 4 %igen Sammelgel verwendet (Tabelle 2-1). Der SDS-Laufpuffer ist beschrieben unter 2.10. Für Gele, die für den Western-Blot eingesetzt wurden, ist ein vorgefärbter Marker (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas*) verwendet worden (Abbildung 2-6). Parallel zu diesem Gel, das für einen Western Blot verwendet werden sollte, wurde in der Regel zeitgleich in derselben Elektrophoresekammer ein zweites Gel mit exakt der gleichen Beladung elektrophoretisiert. Dieses Gel wurde nach der Elektrophorese für mind. 1 h in Coomassie-Färbelösung gelegt und anschließend in Coomassie-Entfärbelösung, solange bis der Hintergrund farblos war. Die Gele wurden in 7,5 %iger Essigsäure aufbewahrt. Dieses Gel diente als Kontrolle für eine funktionierende Proteinauftrennung bei Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Tabelle 2-1: Rezept zum Gießen eines 14 %igen Polyacrylamid-Trenngeles

	Trenngel (14 %)	Sammelgel (4 %)
30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid	9,33 ml	650 µl
Trenngelpuffer	5 ml	---
Sammelgelpuffer	---	1,25 ml
VE-H₂O	5,67 ml	3,1 ml
TEMED	6,67 µl	5 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	133,3 µl	150 µl

MATERIAL UND METHODEN

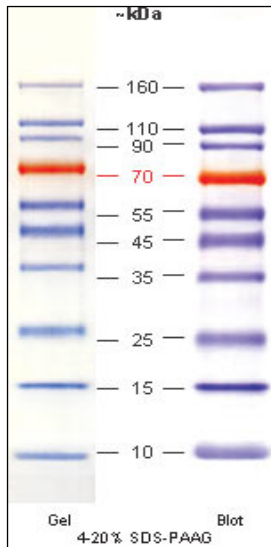


Abbildung 2-6: Foto des verwendeten vorgefärbten Markers von Fermentas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Lot-Nr. 0101). Auf der linken Seite wurde der Marker auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die rechte Seite zeigt den Marker auf einem Western Blot. Die Zahlen in der Mitte zeigen die Molekulargewichte der einzelnen Banden in kDa.

Das für den Western Blot verwendete Polyacrylamidgel wurde nach Anweisungen des Herstellers in einer „Nass-Blot“-Apparatur (*Mini-Trans-Blot*, Biorad) auf eine Nitrocellulosemembran (*Protran BA83*, 0,2 µm Porenweite, Whatman) transferiert. Dies erfolgte in Protein-Transferpuffer bei 80 V für 1,5 h. Nach dem Transfer der Proteinproben auf die Membran wurde diese in fettfreier Trockenmilch (5 % *Non-Fat Dry Milk in PBS-T*, GE Healthcare) für 1 h geblockt und anschließend mit dem ersten Antikörper, verdünnt in 5 % *Non-Fat Dry Milk in PBS-T*, ü. N. bei Raumtemperatur inkubiert (Volumen 10 ml). Die Membran wurde drei Mal für 5 min bei Raumtemperatur mit 25 ml PBS-T gewaschen. Zur Signaldetektion wurde das *ECL Plus Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) verwendet. Ein Auflegen des Films (*Kodak BioMax Light Film*, Sigma-Aldrich) erfolgte für 30 s bis 10 min. Der Film wurde mit Hilfe der Software *AIDA* (Ver. 3.50, Raytest Isotopenmessgeräte) quantifiziert. Dazu wurden gleich große Rechtecke auf dem Film festgelegt und jeweils ein lokaler Hintergrund um die Bande herum definiert, der von der eigentlichen Signalstärke abgezogen wurde.

Um ein gleiches Beladen der einzelnen Spuren nochmals optisch zu kontrollieren, wurden Färbungen der Membran mit 5 %iger Ponceau S Lösung in Essigsäure durchgeführt. Nach zweiminütiger Färbung wurde die Membran für 10 min gewässert, wodurch eine rote Färbung der Proteinbanden erkennbar wurde.

2.8 Immunhistochemie

Die Antikörperfärbung von Gewebeschnitten wurde mit Tieren durchgeführt, die durch eine Ätherdampf-Umgebung getötet worden sind. Anschließend wurde der Brustkorb geöffnet und

MATERIAL UND METHODEN

das Herz frei präpariert. Das Perfusionsfixativ Paraformaldehyd-Lysin-Perjodat (PLP) wurde nach Öffnung des Herzens mit Hilfe einer Schlauchpumpe über den linken Herzventrikel in die Aorta ascendens gepumpt, um somit über die Kapillaren alle Gewebe vollständig zu fixieren. Nach zehnmütiger Fixierung wurden die Gewebe entnommen und in 10 mM PBS bei 4 °C bis zum Schneiden gelagert. Ein bis zwei Tage vor dem Schneiden wurden die Gewebe solange der Reihe nach in 10, 20 und 30 %ige Saccharoselösung (in VE-Wasser) eingelegt, bis die Gewebe zu Boden gesunken waren. Je nach Gewebeart und -größe dauerte dieser Vorgang 2-12 h. Stark fetthaltige Gewebe wurden weiterverwendet, auch wenn nach 12 h noch kein Absinken erfolgte. Die Gewebe wurden mit einem Gefriermikrotom 40 µm dick geschnitten. Gehirnschnitte wurden in 30 %ige Saccharoselösung eingelegt und darin zur Langzeitlagerung bei -20 °C aufbewahrt. Vor der weiteren Verwendung für die Immunhistochemie wurden die Schnitte für 10 min in 10 mM PBS gelegt und ein Mal gewaschen. Die Detektion der Proteinexpression erfolgte im Gehirn mit frei schwimmenden Schnitten. Alle anderen Gewebe wurden nach dem Schneiden direkt auf silanisierte Objektträger aufgebracht und darauf mit Antikörpern inkubiert. Die Durchführung der Antikörperfärbungen erfolgte auf zwei verschiedene Arten (vgl. 2.8.1 und 2.8.2), wobei die in Tabelle 2-2 dargestellten, aus Kaninchen oder Maus stammenden Erstantikörper verwendet wurden. Die Kaninchenserum wurden zur Affinitätsreinigung der Antikörper über SulfoLink-Säulen (GE Healthcare) aufgereinigt.

Tabelle 2-2: Für Immunhistochemie eingesetzte Erstantikörper

Antikörper	Zur Immunisierung eingesetztes Epitop	Firma	Eingesetzte Verdünnung	Name (intern)
rabbit- α -Ngb (polyklonal)	NH ₃ ⁺ -CLSSPEFLDHIRKVML-COO ⁻	Eurogentec	1:50	α -Ngb-TB1
rabbit- α -Cygb (polyklonal)	NH ₃ ⁺ -EKVPGEMEIERRERS-COO ⁻ NH ₃ ⁺ -MEDPLEMERSPQLRK-COO ⁻ NH ₃ ⁺ -VVENLHDPDKVSSVL-COO ⁻	Eurogentec	1:50	HsCygb1-N HsCygb2-M HsCygb3-V
rabbit- α -NPY (Neuropeptid Y) (polyclonal)	Peptid	Amersham	1:1000	NPY
mouse- α - Cytochrom c (monoklonal)	Ratte Cytochrom c	Dianova MA1- 21875	1:100	Cytochrom c Klon 6H2.B4
rabbit- α -nNOS (polyklonal)	C-Terminus-Peptid aus Sequenz der Ratte	Progen- Biotechnik	1:100	nNOS
rabbit- α -von- Willebrand-Faktor (polyklonal)	humanes natives Protein aus Plasma	Abcam	1:200	Von-Willebrand-Faktor

2.8.1 Peroxidasenachweis der Proteinexpression in Geweben

Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit Hilfe des *NovaDetect Detection System Kits, Anti-rabbit, HRP/AEC* (Dianova). Die Detektionsmethode beruht auf der Verwendung eines spezifischen Erstantikörpers aus Kaninchen sowie eines biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen Antikörpers. Bei der Verwendung eines Erstantikörpers aus der Maus kam ein biotinylierter Ziege-anti-Maus Antikörper (Jackson Immuno Research) zum Einsatz. Die Detektionsreaktion erfolgte mit Peroxidase-markiertem Streptavidin, AEC Substrat und AEC Chromogen. Die Erstantikörperinkubation wurde bei 4 °C ü. N. in 10 mM PBS durchgeführt, welches auch zum Waschen der Schnitte verwendet wurde. Teilweise sind die Schnitte mit DAPI (10 min, 1:100 in 10 mM PBS; Roche Diagnostics) gegengefärbt worden, und alle Schnitte mit para-Phenylendiamin-haltigem Einbettmedium verschlossen.

2.8.2 Immunfluoreszenznachweis der Proteinexpression in Geweben

Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte zum Teil mit Fluoreszenzantikörpern. Die Methode beruht auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, welches durch einen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelten Zweitantikörper hervorgebracht wird.

Das Protokoll der Färbung der Schnitte sieht die Inkubation mit dem Erstantikörper (in 0,1 % Triton X-100 und 1 % normalem Schweineserum (NSS) in 10 mM PBS) bei 4 °C ü. N. vor. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit 25 ml 10 mM PBS bei RT erfolgte die Inkubation ebenfalls bei RT mit dem Zweitantikörper (1:100 verdünnte Cy3-konjugierte F(ab')₂-Esel-anti-Kaninchen-IgG (H+L) Fragmente (Dianova) in 1 % NSS) für 90 min. Nach dem einmaligen Waschen der Schnitte für 5 min in 10 mM PBS wurden sie auf dem Objektträger mit para-Phenylendiamin-haltigem Einbettmedium verschlossen, um die Fluoreszenz zu erhalten. Um zu testen, ob der Antikörper im Gewebe spezifisch das gewünschte Protein erkennt, wurde vor der Inkubation mit dem Erstantikörper eine Präadsorption mit verschiedenen Mengen des rekombinanten, murinen Proteins durchgeführt. Dazu wurden die standardmäßig eingesetzten Verdünnungen der Antikörper mit 1, 5, 15 und 45 µg rekombinantes Protein in 10 mM PBS versetzt und ü. N. bei 4 °C präadsorbiert. Es wurden auch Negativkontrollen ohne Antikörper und Positiv-Kontrollen ohne das rekombinante Protein durchgeführt. Eine Spezifität des Antikörpers war dann gewährleistet, wenn das Signal mit zunehmender Menge rekombinanten Proteins schwächer wurde bzw. es vollkommen verschwunden war.

Ein Durchführen aller Antikörperfärbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen war leider nicht immer möglich, da die verwendeten Tiere teilweise schon recht alt waren. In Zellen älterer Lebewesen findet man vor allem in Gehirn und Leberzellen oftmals Lipofuszin-Einlagerungen. Dabei handelt es sich um Lipide von Membranresten, die durch die Lysosomen nicht vollständig abgebaut werden und sich in den Zellen besonders von Leber, Herz und Nervensystem ablagern. Dieses „Alterspigment“ hat die Eigenschaft, dass es beim Betrachten im Fluoreszenzlicht verschiedenster Wellenlängen leuchtet. Dieses Leuchten konnte nur dadurch von spezifischen Signalen unterschieden werden, dass es in allen vorhandenen Fluoreszenzfiltern des Mikroskops fluoreszierte. Eine sehr gute Reduktion der Autofluoreszenz konnte durch Inkubation der Schnitte mit 10 mM CuSO₄ (in 50 mM Ammoniumacetat, pH 5,0) vor Exposition mit dem Erstantikörper erreicht werden (Schnell et al. 1999). Leider habe ich diese Methode erst gegen Ende der vorliegenden Arbeit kennengelernt, sodass nur wenige Immunschnitte mit der Fluoreszenzmethode inkubiert werden konnten. Zur Dokumentation der immunhistochemischen Schnitte wurde ein Fluoreszenzmikroskop des Typs Aristoplan (Leitz) verwendet.

2.9 Operation der Schweine in tiefer Hypothermie

Die Behandlung der Tiere ist in Abdul-Khaliq et al. (2001) exakt beschrieben und das grundlegende Modell in Abbildung 2-7 zusammengefasst. Die Durchführung der Operation der Schweine erfolgte am Deutschen Herzzentrum, Berlin bei der Arbeitsgruppe von PD Dr. Abdul-Khaliq und Dr. Stephan Schubert. Es wurden folgende operativen Eingriffe vorgenommen: Nach Anästhesie wurden alle Schweine an die extrakorporale Zirkulation (EKZ) angeschlossen und die Tiere bei voller Fließgeschwindigkeit für 20 min normotherm perfundiert (rektale Temperatur: 37-38 °C). Um genügend Flüssigkeit für die EKZ bereitzustellen, wurde Schweinespenderblut mit einem Hämoglobingehalt von 7 mg/dl eingesetzt. Die Tiere wurden dann durch die EKZ innerhalb von 30 min auf eine rektale Temperatur von 14 °C abgekühlt. Außer den Kontrolltieren, die nicht operiert wurden und unbehandelt blieben, wurden die Tiere durch Abschalten der EKZ einem Kreislaufstillstand unterzogen, der notwendig ist, um Operationen am offenen Herzen durchführen zu können. Die Dauer dieses Kreislaufstillstandes betrug 60 oder 120 min (DHCA 60 bzw. DHCA 120), wobei das Herz so tief gekühlt wurde, dass es nicht mehr schlug. Eine kühle kardioplegische Lösung wurde in die Koronararterien appliziert, um den Sauerstoffverbrauch des Herzens von 10 ml / 100 g auf 0,05 ml / 100 g zu reduzieren. Während der dann folgenden 45-minütigen

MATERIAL UND METHODEN

Reperfusionphase wurde die Temperatur mit Hilfe der EKZ auf 38 °C gebracht. Die Tiere wurden dann von der EKZ entwöhnt und für 6 h permanent überwacht, bevor die Probenentnahme aus dem Gehirn erfolgte. Bei einem Tier gab es während des Anschließens der EKZ Komplikationen am Bypass, also der Umleitung des Blutes, sodass dieses Schwein zusätzlich normothermer Hypoxie ausgesetzt war. Dieses Tier wurde zusätzlich einem 60-minütigen Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie ausgesetzt. Weitere Versuche wurden mit Tieren durchgeführt, die 24 h und wenige Stunden vor Versuchsbeginn mit dem Kortisonverwandten Steroidhormon Methylprednisolon behandelt wurden, welches entzündungshemmend und immunsuppressiv wirkt. Den Tieren wurde das Steroid entweder durch intramuskuläre Injektion systemisch verabreicht oder intrathekal (in den Duralsack der Wirbelsäule) injiziert (anschließend DHCA120). Eine weitere Versuchsgruppe wurde vor Beginn der Operation zweifach mit dem experimentellen Immunsuppressivum FK506 behandelt. Die erste Applikation erfolgte 24 h, die zweite wenige Stunden vor der Operation.

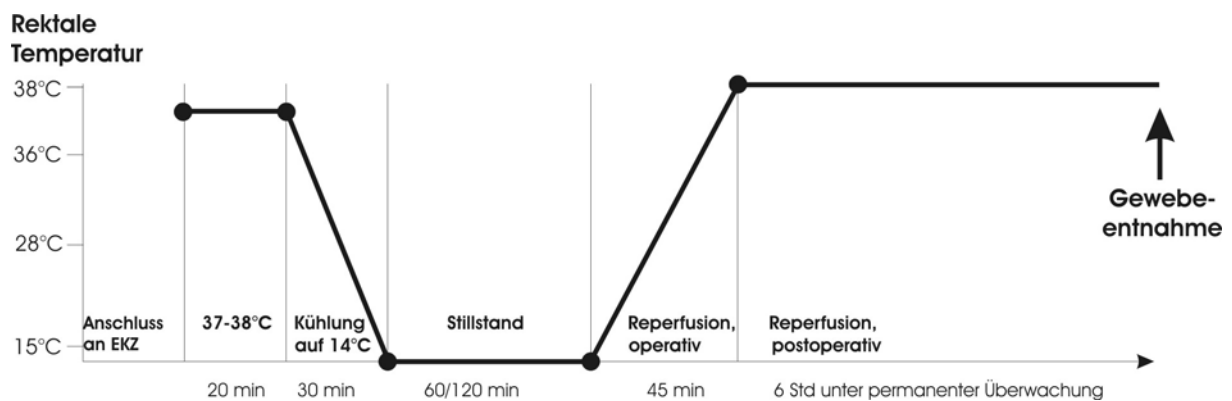


Abbildung 2-7: Ablauf der Behandlung der Schweine zur Durchführung von Operationen am offenen Herzen in tiefer Hypothermie (DHCA) durch Anschließen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ). Nach Kühlung des Körpers auf 14 °C rektaler Temperatur wird die EKZ abgeschaltet. Nur während dieses Kreislaufstillstandes können Operationen am Herzen durchgeführt werden. Zur Reperfusion wurde die EKZ wieder angeschaltet, um eine schnelle Erwärmung des Körpers zu erreichen.

2.10 Puffer und Lösungen

Coomassie-Entfärbelösung

20 % Isopropanol
7,5 % Essigsäure

Coomassie-Färbelösung

40 % Methanol
12,5 % Essigsäure
0,2 % (w / v) Coomassie-Brilliant Blau G-250

MATERIAL UND METHODEN

DEPC-Wasser	0,1 % Diethylpyrocarbonat in A. bidest ü. N. bei Raumtemperatur rühren, dann autoklavieren
Dialysepuffer, 10 x	0,25 M Tris 3 M NaCl 0,1 M Na ₂ EDTA
DNA-Ladepuffer	4 M Harnstoff 0,1 M Na ₂ EDTA 0,1 % Bromphenolblau (w / v) 50 % Saccharose (w / v)
E-Puffer, 10 x	360 mM Tris 30 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ EDTA
Homogenisierungspuffer	58 g Saccharose 10 ml 0,1 M Na ₂ EDTA pH 7,4 2,5 ml 0,1 M Na ₂ EGTA pH 7,4 50 ml Puffer A (10 x) ad 500 ml A. bidest
MOPS-Puffer, 10 x	200 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure 50 mM Na-Acetat 10 mM Na ₂ EDTA pH 7,0
MOPS-Puffer, 1 x	MOPS-Puffer, 10 x, 1:10 verdünnt in DEPC-H ₂ O

para-Phenylendiamin haltiges Einbettmedium

- Lsg. 1 (50 ml): 10 mM Na₂HPO₄
10 mM NaCl
- Lsg. 2 (50 ml): 10 mM NaH₂PO₄
10 mM NaCl
- Lsg. 3: 2,5 ml aus Lsg. 1 + 22,5 ml VE-H₂O
- Lsg. 4: 2,5 ml aus Lsg. 2 + 22,5 ml VE-H₂O
- Lsg. 5: zu Lsg. 3 so lange Lsg. 4 hinzugeben, bis pH 8,0
- Lsg. 6: 10 ml Lsg. 5 + 10 mg p-Phenylendiamin und
10 ml Glycerin dazugeben, vermischen und
bis zur Verwendung einfrieren.

MATERIAL UND METHODEN

PBS, 10 x (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)

130 mM NaCl
7 mM Na₂HPO₄
3 mM NaH₂PO₄

PBS, 10 mM (10 x)

150 mM NaCl
7,4 mM Na₂HPO₄
2,5 mM NaH₂PO₄
Sollwert pH 7,4

PBS-T

0,2 % Tween in 1 x PBS

PLP-Lösung

4 % Paraformaldehyd (w / v)
1,37 % L-Lysin (w / v)
0,21 % Natriumperjodat
in 1 x PBS

Ponceau S-Lösung

5 % Ponceau S in 5 % Essigsäure

Protein-Laufpuffer (SDS-Polyacrylamidgele)

192 mM Glycin
0,2 % SDS
23 mM Tris / HCl pH 8,3

Protein-Lysepuffer

10 mM Tris / HCl pH 7,4
10 mM NaCl
5 mM MgCl₂
0,1 % Nonidet NP-40
2 mg Pefabloc
16 mg Dithiothreitol
Complete Proteaseinhibitor (Roche Diagnostics,
Konzentration entsprechend Herstellervorgaben)

Protein-Probenpuffer (5 x)

50 mM DTT
10 % SDS (w / v)
0,5 % Bromphenolblau (w / v)
50% Glycerin (v/v)
250 mM Tris / HCl pH 6,8

Protein-Transferpuffer

6,67 mM Glycin
52 mM Tris / HCl
20 % Methanol

MATERIAL UND METHODEN

Puffer A, 10 x	150 ml 2 M KCl 37,5 ml 2 M NaCl 7,5 ml 0,1 M Spermin 25 ml 0,1 M Spermidin 75 ml 1 M Tris / HCl pH 7,4 ad 500 ml A. bidest pH 7,4
RNA-Färbelösung	50% Glycerin 1 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 0,25 % Bromphenolblau (w / v) 0,25 % Xylencyanol FF (w / v)
RNA-Ladepuffer	500 µl Formamid (deionisiert) 100 µl 10 x MOPS-Puffer 150 µl Formaldehyd (filtriert)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris / HCl 0,4 % SDS pH 6,8
SDS, 10 %	10 % (w / v) in VE-Wasser pH mit HCl auf pH 7,2 einstellen
TBE-Puffer, 10x	900 mM Tris 900 mM Borsäure 12,5 mM Na ₂ EDTA
TE-Puffer	1 mM Na ₂ EDTA 10 mM Tris / HCl pH 7,5
Trenngelpuffer	1,5 M Tris / HCl 0,4 % SDS pH 8,8

2.11 Verwendete Oligonukleotide

Klonierung des *Spalax Mb*

CDS Mb

HMR Myo CDS deg for: 5'-ATG GGG CTC AGY GAY GGG GA-3'

HMR Myo CDS deg rev: 5'-AGC CCT GGA AGC CYA GCT CCT-3'

5'RACE Reaktion Spalax Mb

HMR Myo deg CDS rev (GSP1): 5'-AGC CCT GGA AGC CYA GCT CCT-3'

QPCR Myo deg rev (GSP2): 5'-CGG AAC AGC TCC AGG GCC T-3'

S58 Myo 5'RACE rev (nested GSP): 5'-TGC TTG CTC TGC AGG ACC TG-3'

3'RACE Reaktion Spalax Mb

HMR Myo deg CDS for (GSP): 5'- ATG GGG CTC AGY GAY GGG GA -3'

QPCR Myo deg for (nested-GSP): 5'-GCC ACC AAG CAC AAG ATC C-3'

Klonierung des *Spalax Cygb*

CDS Cygb

HMR Cygb deg for: 5'-GCG GTT CAG GCT ACG TG-3'

HMR Cygb deg rev: 5'-CCA GCC CAC TTC CTT GTA GG-3'

3' RACE des Spalax Cygb

QPCR Cygb for (forward GSP): 5'-CCA ACT GCG AGG ACG TGG-3'

Cygb RACE 4F (forward GSP nested): 5'-TCA TCT ACA GCC ACG TGA CCG-3'

MATERIAL UND METHODEN

Quantitative realtime RT-PCR Primer (Zugangsnummern entsprechen den Genen der Ratte). Die verwendeten Primer wurden bei Biomers oder Operon, die MGB- (*Minor Groove Binding*) TaqMan-Sonden bei Applied Biosystems hergestellt. In Klammern sind die Endkonzentrationen der Oligonukleotide notiert.

Neuroglobin (Ngb, NM_033359)

QPCR Ngb For: 5'-GAA GCA YCG GGC AGT G-3' (190 nM)

QPCR Ngb Rev: 5'-AGR CAC YTC TCC AGC ATG TAS AG-3' (190 nM)

QPCR Ngb MGB-Sonde: 6-FAM-5'-CTC AGC TCC TTC TCG ACA GT-3'-NFQ (200 nM)

15 min 95 °C, 40x (15 sec 94 °C, 60 sec 60 °C)

Cytoglobin (Cygb, NM_130744)

QPCR Cygb For: 5'-CCA ACT GCG AGG ACG TGG-3' (190 nM)

QPCR Cygb Rev: 5'-ACT GGC TGA AGT ACT GCT TGG C-3' (190 nM)

QPCR Cygb Mgb-Sonde: 5'-CTG GTG AGG TTC TTT GTG-3'-NFQ (200 nM)

15 min 95 °C, 40x (15 sec 94 °C, 60 sec 60 °C)

Myoglobin (Mb, NM_021588)

QPCR Myo For: 5'-GCC ACC AAG CAC AAG ATC C-3' (70 nM)

QPCR Myo Rev: 5'-CGG AAC AGC TCC AGG GCC T-3' (70 nM)

15 min 95 °C, 40x (15 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 30 sec 72 °C)

Acidic ribosomal phosphoprotein P0 (Rplp0, NM_022402)

QPCR ARP for: 5'-AGG GCG ACC TGG AAG TCC-3' (190 nM)

QPCR ARP rev: 5'-GCA TCT GCT TGG AGC CCA-3' (190 nM)

15 min 95 °C, 40x (15 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 30 sec 72 °C)

MATERIAL UND METHODEN

Cyclophilin A (Cyph, XM_578076)

QPCR Cyph for: 5'-TCC TTT GAG CTG TTT GCA GAC-3' (190 nM)

QPCR Cyph rev: 5'-CGT GTC AAG TCA CCA CCC TG-3' (190 nM)

15 min 95 °C, 40x (15 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 30 sec 72 °C)

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh, XM_579386)

QPCR Gapdh for: 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG G-3' (190 nM)

QPCR Gapdh rev: 5'-TTC CCA TTC TCA GCC TTG AC-3' (190 nM)

15 min 95 °C, 40x (15 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 30 sec 72 °C)

Vascular endothelial growth factor (Vegf; NM_031836)

QPCR Vegf for: 5'-CGCAGACGTGTAAATGTTTCCTG-3'

QPCR Vegf rev: 5'-CACCGCCTCGGCTTGTCACAT-3'

15 min 95 °C, 40x (15 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 30 sec 72 °C)

Adrenomedullin (Adm; NM_012715)

QPCR Adm for: 5'-CAG GAC AAG CAG AGC ACG TC-3'

QPCR Adm rev: 5'-TCT GGC GGT AGC GTT TGA C-3'

15 min 95 °C, 40x (15 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 30 sec 72 °C)

2.12 Firmenverzeichnis

Abcam, Cambridge, Großbritannien
Amersham Biosciences, Freiburg
Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Biomers.net GmbH, Ulm
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dianova GmbH, Hamburg
Eppendorf AG, Hamburg
Eurogentec Proteomics GmbH, Köln
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GE Healthcare, München
Genomatix Software GmbH, München
GENTERprise Genomics GmbH, Mainz
Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Jackson Immuno Research Laboratories, Newmarket, Großbritannien
Operon Biotechnologies GmbH, Köln
PqLab GmbH, Erlangen
Progen Biotechnik GmbH, Freiburg
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

3 Ergebnisse

3.1 Modellsystem *Blindmaus Spalax ehrenbergi*

3.1.1 Das Neuroglobingen von *Spalax*

3.1.1.1 Genom-Organisation und molekulare Evolution des Neuroglobingens

Die Sequenz und Organisation des Neuroglobingens der Spezies *S. carmeli* ($2n=58$) wurde bereits in meiner Diplomarbeit untersucht (Gerlach 2002; Gerlach et al. 2006, NCBI Datenbank-Einträge: Ngb mRNA: AM489450; Genom Sequenz: AM489447; Sequenzen z. Zt. noch vertraulich in Datenbanken eingetragen, Sequenzalignment der kodierenden Bereiche siehe Anhang 2). Die hier vorliegende Arbeit erweitert die Daten dadurch, dass ein größerer Promotorbereich aus dem Ngb-Gen von *S. carmeli* ($2n=58$) isoliert werden konnte (Gesamtlänge des Promoters ohne 5'UTR: ca. 1.500 Bp), das Gen mit weiteren Vertebraten-Spezies verglichen sowie eine umfangreichere komparative Promoteranalyse durchgeführt wurde.

Die komparative Sequenzanalyse orthologer DNA-Sequenzen zwischen Vertebraten ist ein effektives Werkzeug zur Identifizierung konservierter translaterter sowie genregulatorischer Sequenzen (Hardison et al. 1997; Ansari-Lari et al. 1998; Ellsworth et al. 2000; Wasserman et al. 2000; Berezikov et al. 2004; Grad et al. 2004). Das *Spalax* Ngb-Gen wurde daher den orthologen Bereichen aus Ratte, Maus, Mensch und Hund unter Zuhilfenahme einer MultiPip-Grafik (Multipler *Percent Identity Plot*; Schwartz et al. 2000) gegenübergestellt, um *Spalax*-sowie Nagetier-spezifische Sequenzbereiche zu finden. Außerdem wurden über alle Spezies hinweg konservierte Abschnitte gesucht. Der Algorithmus berechnet duale, lokale Sequenzvergleiche mit Hilfe des BlastZ-Algorithmus (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>, Schwartz et al. 2000) zwischen der Referenzsequenz (*S. carmeli* ($2n=58$)) und jeweils einer Vergleichssequenz. Der erhaltene *Percent Identity Plot* (PIP) stellt die im Vergleich zu der Referenzsequenz erhaltenen Sequenzidentitäten im Bereich von 50 bis 100 % grafisch dar (Abbildung 3-1). Der Plot zeigt Sequenzübereinstimmungen im Bereich der Exons des Ngb-Gens von 85 bis 90 %. Die Ngb-Gen-Introns, der putative 5' und 3' untranslatierte Bereich sowie flankierende DNA weisen einen weitaus niedrigeren Grad an Sequenzkonservierung zwischen den untersuchten Spezies auf. Das Vorkommen Nagetier-spezifischer SINE *Repeats* (*Short Interspersed Nuclear Elements*) trägt zu einem generellen Fehlen von Konservierung im potenziellen Ngb-Promotorbereich zwischen *Spalax* und Mensch bzw. Ratte bei

E R G E B N I S S E

(Abbildung 3-1). Beim genaueren Betrachten der lokalen Sequenzalignments des kompletten Promotorbereiches erkennt man kurze DNA-Stücke von 5-25 Bp Länge mit bis zu 80 % Konservierung, die transkriptionsregulatorische Sequenzen enthalten könnten (vgl. 4.1.3).

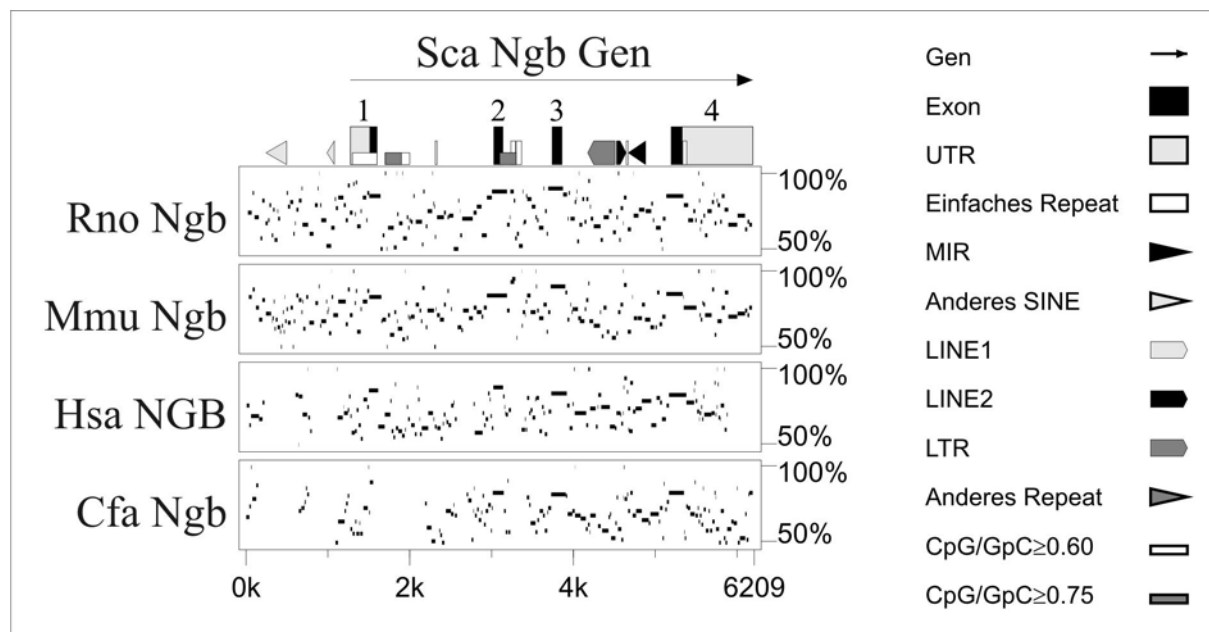


Abbildung 3-1: Sequenzvergleich des *Spalax carmeli* (2n=58) Neuroglobin Gens mit den orthologen Genen aus Ratte (Rno; *Rattus norvegicus*), Maus (Mmu; *Mus musculus*), Mensch (Hsa; *Homo sapiens*) und Hund (Cfa; *Canis familiaris*). Bei den Berechnungen handelt es sich um vier duale Vergleiche zwischen der Referenzsequenz aus *Spalax* und den Sequenzen aus den anderen Spezies. Die *Spalax* Ngb Sequenz wurde mit Hilfe des Programmes *Repeatmasker* auf Sequenzwiederholungen hin untersucht, die im oberen Bereich der Abbildung dargestellt sind. Auffällig hieran sind die nagetierspezifischen repetitiven Einheiten im Promoterbereich des Gens.

Um den Promotorbereich auf CpG-Inseln sowie repetitive Einheiten hin zu untersuchen, wurde das Programm *RepeatMasker* (Smit et al. 1996-2004; <http://www.repeatmasker.org>) verwendet. Die CpG-Insel, die in Exon 1 und Teilen von Intron 1 im menschlichen und murinen Ngb-Gen gefunden wurde, existiert auch im *Spalax carmeli* (2n=58) Ngb-Gen. Hier überspannt sie einen Bereich von ca. 300 Bp und wurde auch in Ratte und Hund gefunden (Daten nicht gezeigt). Intron 1 weist eine weitere ca. 300 Bp lange CpG-Insel auf, die ebenfalls in *Spalax*, Ratte, Maus und Mensch vorhanden ist. In der genomischen Sequenz des Hundes fehlt an dieser Stelle in der Datenbank ein 430 Bp langes Stück Sequenz, beginnend schon in der kodierenden Sequenz am 3'-Ende des Exons 1. Weiterhin gibt es eine CpG-Insel am Anfang des Introns 2 (200 Bp), die wiederum in allen fünf untersuchten Spezies vorkommt.

ERGEBNISSE

Eines der beiden säugetierspezifischen SINE- (*Short Interspersed Nuclear Element*-) Repeats ist 1 kbp stromaufwärts von Exon 1 lokalisiert und ist ein SINE/B4- (B4A-) Element (253 Bp Länge). Das zweite SINE ist ein Alu- (PB1D10-) Repeat (90 Bp Länge), positioniert 500 Bp stromaufwärts von Exon 1. In dieser Region haben Maus und Ratte beide Sequenzen mit hoher Übereinstimmung zu *Spalax*. Hund und Mensch zeigen in dieser Region keine Sequenzübereinstimmung von über 50 %.

Ein MIR (*Mammalian-wide Interspersed Repeat*) Element (MIRb) wurde in Intron 3 aller untersuchten Spezies gefunden (Länge: 212 Bp). Nur Ratte und Maus haben in diesem MIRb Element eine synapomorphe 30 Bp Deletion. In Mensch und Hund hat dieses Repeat die gleiche Länge wie in *Spalax* und eine zwischen *Spalax* und Mensch konservierte Sequenz von 75 %, sowie von 69 % zwischen *Spalax* und Hund.

Ein strikt zwischenartlich konserviertes LINE (*Long Interspersed Nuclear Element*) vom Typ L2 (117 Bp Länge) ist in Intron 3 lokalisiert. In diesem Bereich gibt es ein Cluster verschiedener kürzerer Repeattypen, die in allen Spezies vorhanden sind. Ein weiteres konserviertes LINE2 Element, MaLR (*mammalian long-terminal-repeat-retrotransposon*) Element (MLT1H2, Länge: 334 Bp) ist ebenfalls in Intron 3 vorhanden. MLT1H gehört zur Gruppe der alten Retrovirus-artigen LTRs (*long terminal repeats*).

Einfache Sequenzwiederholungen wurden in allen drei Introns und dem 3'UTR des Ngbs gefunden. In Intron 1 gibt es ein (CA)_n Repeat (23 Bp Länge), das auf das Vorkommen in *Spalax* beschränkt ist (Avivi et al., in Vorbereitung). Das zweite Intron des Ngb-Gens von *Spalax* hat zwei repetitive Elemente. Das erste ist wiederum ein (CA)_n Element von 57 Bp Länge und kommt in Ratte und Maus vor, nicht aber in Mensch und Hund. Das zweite Repeat in dieser Region hat die DNA-Sequenz (CAGAGA)_n mit einer Länge von 66 Bp und kommt nur in *Spalax* vor. Eine weitere einfache Sequenzwiederholung von 48 Bp befindet sich im 3'UTR. Die repetitive Sequenz ist (TCTG)_n und existiert nur in *Spalax*. Bereiche einfacher Sequenzwiederholungen haben das Potenzial, Genregulation zu beeinflussen (Review: Kashi und King 2006), was möglicherweise dazu führt, dass diese Repeats die Regulation von Ngb auf eine *Spalax*-spezifische Weise beeinflussen.

3.1.1.2 Zelluläres Expressionsmuster von Ngb im Gehirn

Das Expressionsmuster von Neuroglobin in *Spalax* wurde durch Immunfärbung u. a. im Gehirn untersucht. Im Zentralnervensystem zeigten neuronale Perikarya ebenso wie die Zellfortsätze Ngb-Immunfärbung; Kerne hingegen waren frei von Immunreaktion (Abbildung 3-3 C). Beobachtet wurde eine ubiquitäre, globale Ngb Expression im *Spalax* Gehirn. Stärkere

ERGEBNISSE

Signale wurden in Bereichen mit höherer Neuronendichte beobachtet, wie dem frontalen Cortex sowie der Hippocampusregion. Die Intensität der Färbung der einzelnen Neurone auf zellulärer Ebene war in allen Bereichen des Gehirns etwa gleich stark. Abbildung 3-2 zeigt einen Frontalschnitt auf Ebene der vorderen Kommissur, die die weitverbreitete Ngb-Expression darstellt. Stärkere Vergrößerungen zeigten Ngb-positive Neurone der Hippocampusformation (Abbildung 3-3 A und B).

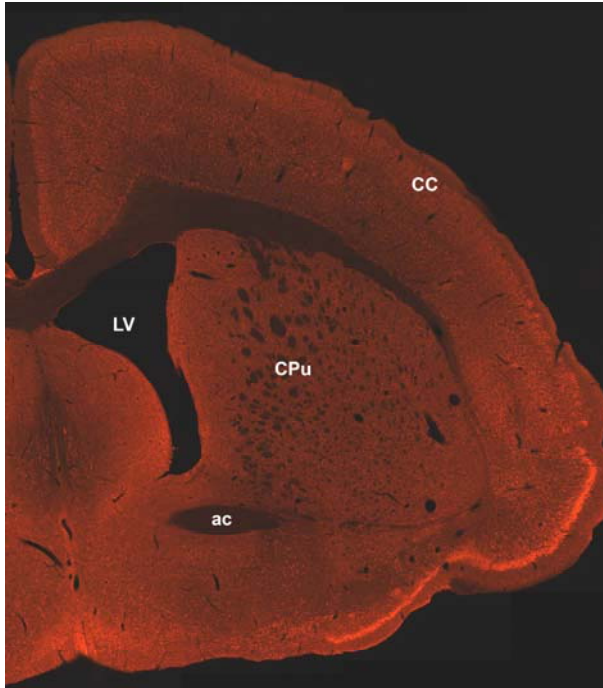


Abbildung 3-2: Neuroglobin Immunfluoreszenz in einem Frontalschnitt des *S. golani* (2n=54) Gehirns auf Ebene des lateralen Ventrikels (LV) und der vorderen Kommissur (ac). Gefärbte Neurone sind im cerebralen Cortex (CC), im Striatum (caudates Putamen CPu) sowie in den medialen und basalen Vorderhirnregionen zu erkennen.

Zusätzlich zu den Neuronen wurde Expression in einer zweiten Klasse von Gehirnzellen detektiert, den Gliazellen. Die Schnitte aus Abbildung 3-4 wurden dem Corpus callosum entnommen. Sie zeigten Zellen, die sowohl für Ngb als auch für GFAP immunreaktiv waren. Die Immunreaktion unterschied sich nicht sichtlich zwischen normoxisch und hypoxisch (6 h, 3 % O₂) gehaltenen Tieren.

ERGEBNISSE

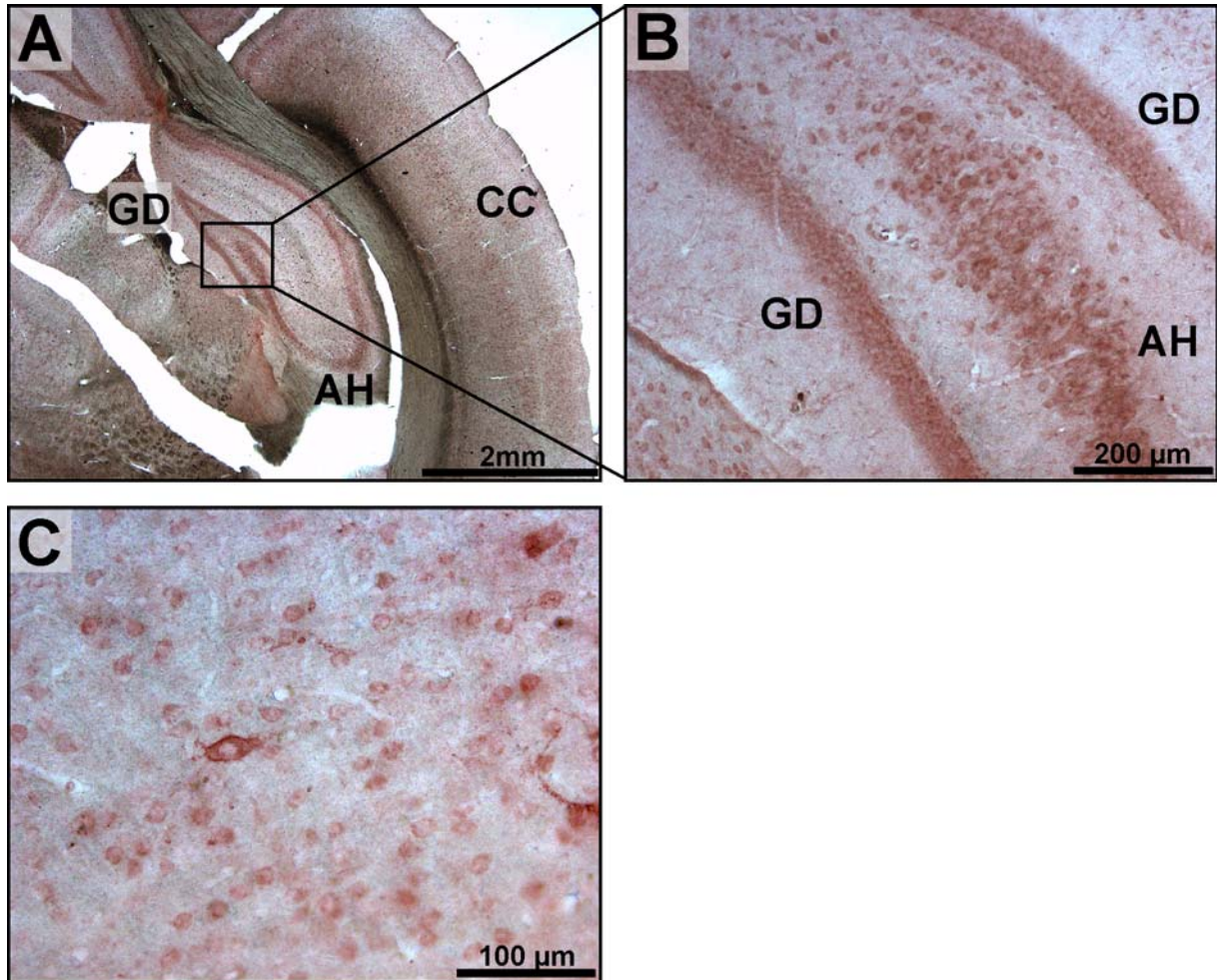


Abbildung 3-3: Verschiedene Vergrößerungen der Neuroglobin-Immunreaktionen im Gehirn von *S. golani* ($2n=54$). A. Frontale Übersichtsaufnahme durch den Bereich der Hippocampus-Formation (Ammonshorn AH und Gyrus dentatus GD) und des frontalen Cortex cerebri (CC). B. Stärkere Vergrößerung eines Ausschnittes von A zeigen Ngb-positive Neurone im Bereich des AH und des GD. C. Die gefärbten Zellen zeigen klar, dass Ngb im Zytoplasma von Neuronen vorhanden ist und nicht im Zellkern vorkommt.

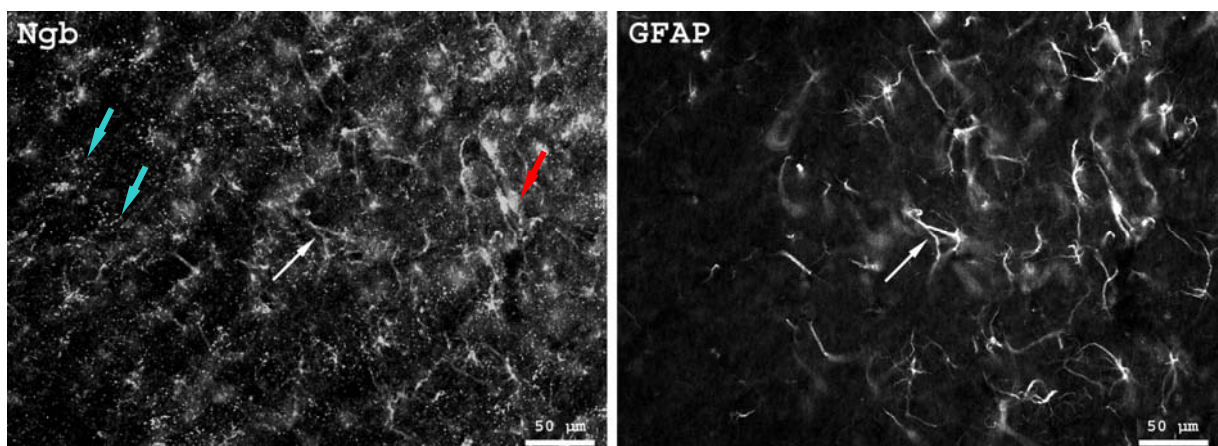


Abbildung 3-4: Ngb-Immunreaktion wurde auch in Astrozyten, die durch das *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) identifiziert wurden, detektiert. Dargestellt ist der Bereich des minoren Forceps des Corpus callosum. Weiße Pfeile in beiden Abbildungen zeigen doppelt-gefärbte Astrozyten. Zu beachten

sind die quergeschnittenen Ngb-positiven Zellausläufer, die keine GFAP-Färbung zeigen. Diese sind als kleine Punkte zu erkennen (blaue Pfeile). Es handelt sich nicht um unspezifische Färbung. Der rote Pfeil zeigt ein Neuron, das Ngb-positiv und GFAP-negativ ist.

3.1.1.3 Expression der Ngb-mRNA und des Proteins im Gehirn

3.1.1.3.1 Quantitative Untersuchung zur Neuroglobin-mRNA-Expression

Die mRNA-Expression des Ngb-Gens wurde in den Geweben des Gehirn untersucht, von dem, neben der Retina, beschrieben ist, dass sie zumindest in der Maus die Hauptexpressionsorte sind (Gehirn: Burmester et al. 2000; Mammen et al. 2002; Wystub et al. 2003; Burmester und Hankeln 2004; Hankeln et al. 2004; Laufs et al. 2004; Retina: Schmidt et al. 2003; Schmidt et al. 2005).

Bei der Expressionsuntersuchung mit Hilfe der qRT-PCR wurden die konstitutiven Ngb mRNA-Level von Ratte mit denen von *S. galili* (2n=52) und *S. judaei* (2n=60) verglichen (Abbildung 3-5). Für diese Untersuchung wurden die Tiere unter normalen Sauerstoffkonzentrationen von 21 % (Normoxie) gehalten. Parallel wurde auch die mRNA-Expression unter verschiedenen Sauerstoffmangel-Bedingungen (Hypoxie) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-5 zusammengefasst. Der Interspeziesvergleich zeigte, dass beide *Spalax*-Arten Ngb signifikant stärker exprimierten als die Ratte. In *S. judaei* (2n=60) war die Expression unter normoxischen Bedingungen 1,8-fach stärker, in *S. galili* (2n=52) 2,7-fach stärker als in der Ratte. Auch die Unterschiede in der Expression zwischen beiden *Spalax*-Spezies waren signifikant und lagen bei Faktor 1,5. Der *Studentsche* t-Test ergab für alle drei zwischenartlichen Vergleiche einen p-Wert kleiner als 0,05. Die Untersuchung der Genexpression in hypoxischen Gehirnen zeigte, dass in allen Spezies unter fast allen Bedingungen eine Herunterregulation der Ngb-mRNA zu erkennen war. Die Ratte exprimierte nach milder Langzeithypoxie (22 und 44 h bei 10 % O₂) sowie nach stärkerer Kurzzeithypoxie (5 h, 6 % O₂) 50-60 %, verglichen mit dem normoxischen Zustand. Es handelte sich in allen Fällen um eine signifikant schwächere Expression. *S. judaei* (2n=60) exprimierte nach kurzer starker Hypoxie (5 h, 6 % O₂) sowie nach 22 h bei moderater Hypoxie etwa 40-50 % zu den normoxischen Vergleichstieren. Nach 44 h bei 10 % Sauerstoff lag die Expression bei 75 % des normoxischen Wertes. Eine hohe Signifikanz auf dem p<0.01-Level war nur bei kurzer starker Hypoxie gegeben. Betrachtet man die Expression von *S. galili* (2n=52), so fällt auf, dass das Ngb-Gen nach 5 h bei 6 % O₂ auf etwa normoxischen Niveau blieb, bzw. sogar um knapp 10 % anstieg. Wurden die Tiere der 22 h dauernden

E R G E B N I S S E

milden Hypoxie von 10 % Sauerstoff unterzogen, erfolgte eine Herunterregulation des Nbg-Gens auf 45 % des Ausgangswertes, nach 44 h auf etwa 25 %. Die Herunterregulation beider Werte erfolgte lediglich auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,1$, also einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 %. Für diese Versuche wurden RNA-Proben verwendet, die aus kompletten Gehirnen von Einzelindividuen stammten, für die Versuche jedoch gepoolt wurden (aus jeweils zwei bis vier Individuen). Die Versuche wurden mit verschiedenen RNA-Proben mehrfach wiederholt, wodurch es möglich war, Standardabweichungen und Signifikanzen mit Hilfe des t-Tests zu berechnen.

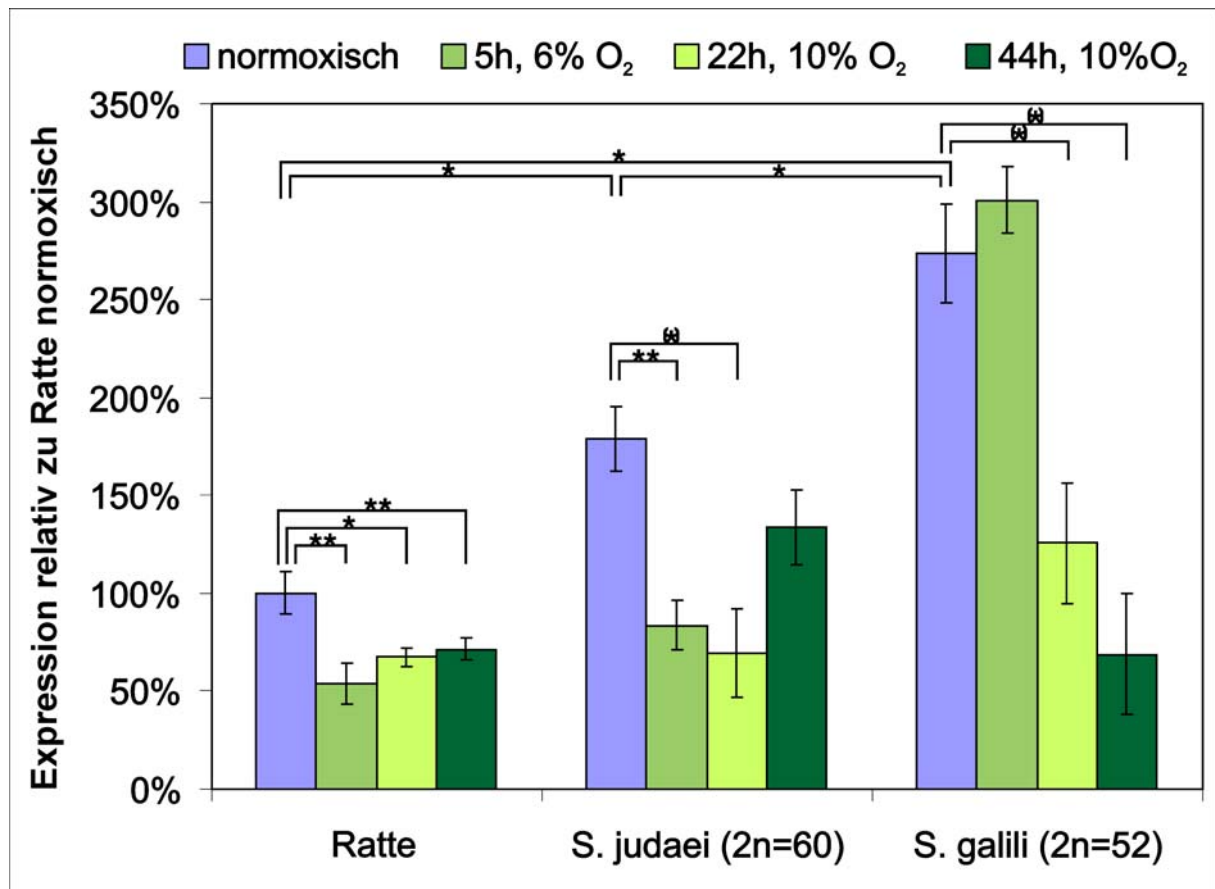


Abbildung 3-5: Expression des Nbg-Gens im Gehirn von Ratte, *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) unter Normoxie (blaue Balken) und unter verschiedenen Hypoxie-Bedingungen (grüne Balken). Alle angegebenen Werte wurden auf die Expression von „Ratte normoxisch“ normalisiert. Als Referenzgen für den Vergleich der Expression unter Hypoxie mit Normoxie diente *Acidic Ribosomal Phosphoprotein* (Rplp0), dessen konstante Expression überprüft und in eigenen Experimenten bestätigt wurde. Für den interspezies-Vergleich wurde kein Referenzgen verwendet (vgl. 2.5.2.1). Eckige Klammern zeigen die Kombinationen, die in paarweisen Vergleichen mit Hilfe des *Studentschen* t-Tests auf Signifikanz überprüft wurden (* $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Es wurden 2-4 Pools aus jeweils 2-4 Tieren miteinander verglichen.

3.1.1.3.2 Untersuchung der Neuroglobin Protein-Expression zwischen Spezies und unter Hypoxie

Interspeziesvergleich. Um die Expression von Neuroglobin auf Proteinebene zu untersuchen, wurden jeweils drei normoxisch gehaltene Tiere der Spezies *Rattus norvegicus*, *S. galili* (2n=52) und *S. judaei* (2n=60) per Western Blot miteinander verglichen. Wie in Abbildung 3-6 A zu erkennen ist, unterschied sich die konstitutive Expression von Ngb stark zwischen Ratte und den beiden *Spalax*-Spezies. Die beiden unterirdisch lebenden Arten exprimierten um Faktor 2,9 bis fast 3,5 mehr Ngb als die Ratte bei normaler Luftsauerstoffkonzentration von 21 %. Festzuhalten ist, dass ein α -Maus Ngb Antikörper verwendet wurde. Die Aminosäuresequenz des Maus Ngbs zeigte eine größere Ähnlichkeit zur Sequenz der Ratte als zur Sequenz der beiden untersuchten *Spalax*-Spezies. Die quantitative Auswertung der Signale des Western Blots wurde mit dem Programm *Aida Version 3.50* (Raytest) durchgeführt (Abbildung 3-6 B).

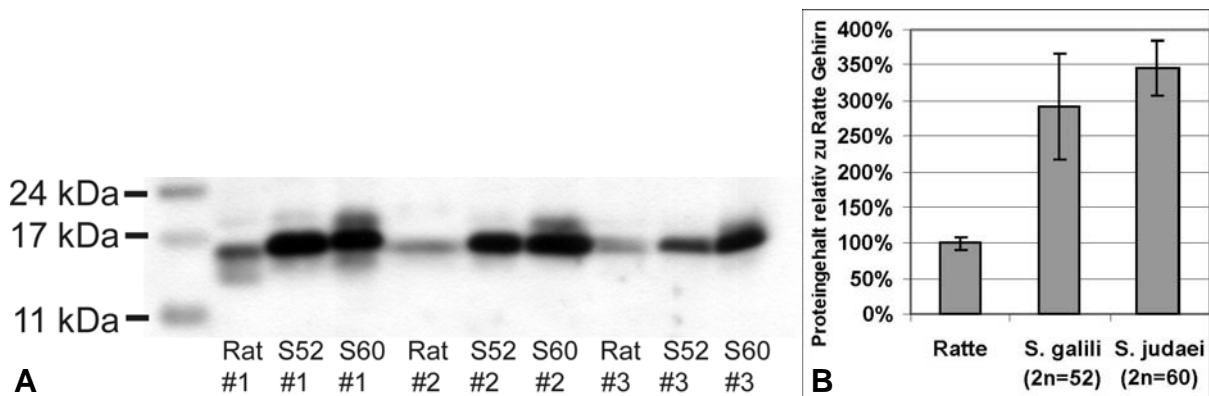


Abbildung 3-6: (A) Ngb-Western Blot von je drei Individuen der Spezies *Rattus norvegicus* (rat), *S. galili* (2n=52; S52) und *S. judaei* (2n=60; S60). Verwendet wurde der Antikörper α NgbTB4. Aufgetragen wurden 135 μ g des Proteinextraktes aus halben Gehirnen von Tieren, die bei 21 % Sauerstoff gehalten wurden. (B) Quantifizierung des Western Blots aus A. mit Hilfe der Aida Software Version 3.50 durch 2D-Densitometrie. Die Schwärzungsintensitäten der drei Signale in einer Spezies wurden gemittelt und der Standardfehler angegeben.

Expression unter Hypoxie. Zur Untersuchung der Ngb-Protein Expression nach Hypoxiestress wurde ein Western Blot mit Ratte, *S. galili* (2n=52) und *S. judaei* (2n=60) durchgeführt (Abbildung 3-7). Dazu wurden bei Ratte zwei normoxisch gehaltene Tiere mit zwei unterschiedlichen Hypoxiezuständen verglichen. Die hypoxischen Tiere wurden für 22 h bei 10 % (n=2) und für 44 h bei 10 % Sauerstoff (n=1) gehalten. Es ist zu erkennen, dass es zu einer verminderten Expression des Ngbs unter Hypoxie kam, auch dann, wenn man die starke Expression der normoxischen Ratte Nr. 2 außer Acht lässt. Die Signalstärke nach 44-

E R G E B N I S S E

stündiger Hypoxie lag in etwa zwischen den Signalstärken der beiden Tiere, die 22 h hypoxisch gehalten wurden. In *S. galili* (2n=52) wurden die gleichen Hypoxiezustände untersucht wie in der Ratte, jedoch nur bei jeweils einem Tier. Hierbei war zu erkennen, dass die Ngb-Expression nach 22 und 44 h auf fast gleich hohem Niveau wie in den beiden normoxischen Tieren blieb, die sich ihrerseits in der Expression kaum unterschieden.

Die beiden normoxischen Tiere der Spezies *S. judaei* (2n=60) zeigten eine leicht unterschiedliche Signalstärke. Nach 22 h war zumindest in einem der beiden Tiere eine etwas schwächere Expression von Ngb zu erkennen als in den normoxischen Proben. Die andere 22 h Probe lag mit ihrer Signalstärke sogar leicht über dem schwächeren Signal der beiden unter normalen Sauerstoffbedingungen gehaltenen Tiere. Die Ngb-Menge in der untersuchten 44 h Probe war fast so stark wie in der stärkeren normoxischen Probe.

Die Auswertung der Western Blots für Ngb ergab also, dass es in *Spalax* unter Hypoxie praktisch keine Veränderung der Proteinexpression gab.

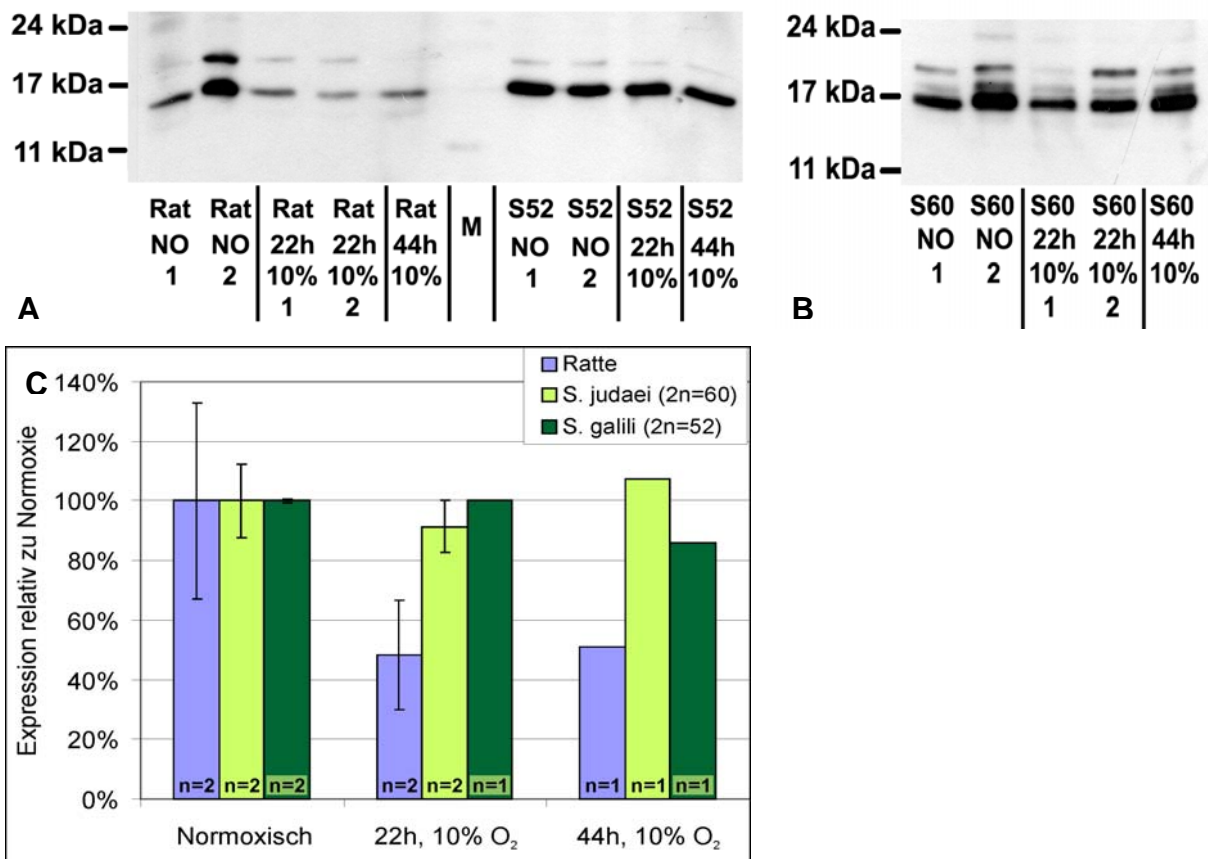


Abbildung 3-7: (A, B) Neuroglobin Western-Blots von hypoxischen Gehirnen von Ratte, *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52). Es wurden 135 µg Gewebeextrakt auf das zu „blottende“ Gel aufgetragen. Dazu wurde der Antikörper αNgbTB4 in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. (C) Auswertung der Western-Blots mit hypoxischen Proben. Die Ratte zeigt im Mittel eine Herunterregulation auf ca. 50 % des normoxischen Wertes. Die beiden *Spalax*-Spezies ändern ihre Expression nur leicht. Die normoxischen Zustände jeder Spezies wurden auf 100 % gesetzt. Ein Interspeziesvergleich ist dieser Abbildung nicht zu entnehmen (vgl. Abbildung 3-6).

3.1.2 Das *Spalax* Cytoglobin (Cygb) Gen

3.1.2.1 Klonierung des *Cygb*-Gens aus *Spalax*

Eine erste Sequenzinformation zum *Cygb*-Gen, die mit Hilfe konservierter Primer erhalten wurde, diente als Ausgangspunkt zum Vervollständigen der cDNA-Sequenz (Gerlach 2002). Ausgehend von dieser schon bekannten Sequenz wurden 5'RACE und 3'RACE Reaktionen durchgeführt.

3.1.2.1.1 Bestimmung des Transkriptionsstart- und -endpunktes der *Cygb*-cDNA

Der Transkriptionsstartpunkt konnte weder mit der konventionellen 5'RACE (vgl. 2.2.1), noch mit dem *GeneRacer Kit* (vgl. 2.2.3; beides Invitrogen) isoliert werden. Um trotzdem eine Sequenzinformation über den Bereich stromaufwärts des bekannten Bereiches zu erhalten, wurde eine Sequenzierung auf Genomebene durchgeführt (vgl. 3.1.2.1.2). Hierdurch konnte naturgemäß jedoch nicht der transkribierte Bereich festgelegt werden, sondern es wurden lediglich Informationen über die potenzielle Promotorregion des *Cygb*-Gens auf Genomebene erhalten.

Der Transkriptionsendpunkt wurde mit Hilfe des *GeneRacer Kits* (vgl. 2.2.3) bestimmt. Das durch *nested PCR* erhaltene Produkt hatte eine Länge von ca. 850 Bp (Abbildung 3-8). Dieses Produkt wurde kloniert und sequenziert. Datenbankrecherchen bestätigten, dass es sich um das orthologe *Cygb*-Gen aus *S. carmeli* ($2n=58$) handelte. Es ergab sich aufgrund einer nicht funktionierenden Klonierung nur eine gesicherte Sequenz von 94 Bp für den 3'UTR aus *S. carmeli* ($2n=58$), der damit jedoch nicht vollständig sequenziert werden konnte. Die vorhandene Sequenz wurde durch direkte Sequenzierung des PCR-Produktes erhalten.

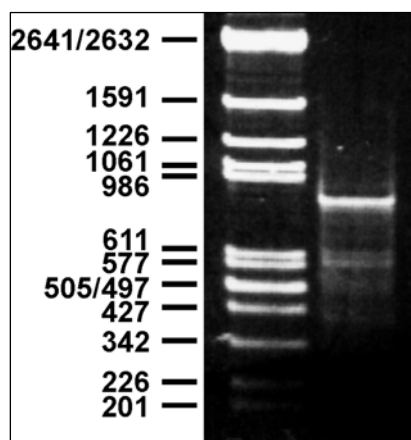


Abbildung 3-8: Gelfoto der *Generacer* (Invitrogen) 3'RACE nested PCR des *S. carmeli* ($2n=58$) *Cygb*-Gens. In der rechten Spur ist eine starke Bande der Größe 850 Bp zu erkennen, die im Anschluss an die PCR kloniert und teilweise sequenziert wurde.

ERGEBNISSE

3.1.2.1.2 Klonierung des *S. carmeli* (2n=58) *Cygb*-Gens auf Genomebene

Die Genomsequenz des *Cygb*-Gens wurde durch *Genome Walking* (vgl. 2.3) ausgehend von schon bekannten Teilsequenzen (Gerlach 2002) isoliert. Die für die PCR mit dem AP1- und den genspezifischen *Mmu CygbRA2* (1. PCR) und *S58 Cygb Race 3R* (2. bzw. nested PCR) Primer verwendete genomische DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease Bgl II verdaut. Aus dieser PCR ergab sich ein Produkt der Länge von ca. 150 Bp, welches neben einem kleinen noch unbekanntem Teil des kodierenden Bereiches auch wenige Basen des potenziellen 5'UTRs enthielt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin das erste Intron des *Cygb*-Gens aus *S. carmeli* (2n=58) isoliert und sequenziert. Das PCR-Produkt, das mit Primern erstellt wurde, die in Exon 1 bzw. Exon 2 lagen (*QPCR Cygb for* und *QPCR Cygb rev*), hatte eine Länge von knapp 5 kBp (Abbildung 3-9). Zur Amplifikation dieses Abschnittes wurde das *Expand Long Template PCR System* von Roche Diagnostics verwendet. Intron 2 und Exon 3, sowie ein erweiterter 5'-Bereich des *Spalax Cygb*-Gens aus *S. carmeli* (2n=58) wurden durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Aaron Avivi (Institut für Evolution, Haifa) sequenziert. Der Eintrag in die NCBI-Datenbank erfolgte unter der Zugangsnummer AM489449 (z. Zt. noch nicht freigegeben).

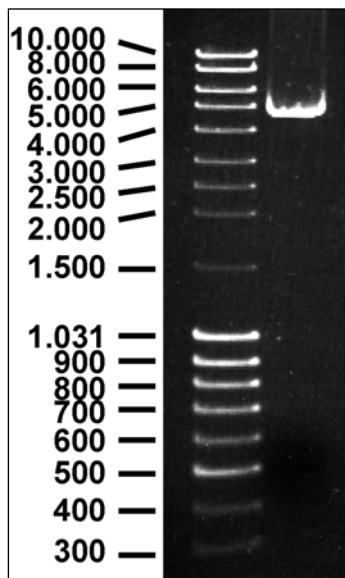


Abbildung 3-9: Gelfoto des amplifizierten Introns 1 des *S. carmeli* (2n=58) *Cygb*-Gens. Das PCR-Produkt hat eine Länge von knapp 5 kBp. Die Sequenz wurde mittels *Primer-Walking* sequenziert.

3.1.2.2 *Genomorganisation und Sequenzvergleiche des Cygb-Gens*

Das Cytoglobingen in *Spalax* besitzt, wie die anderen bekannten orthologen Mammaliengene auch, eine vier Exon-drei Intron Struktur mit Introns an den Aminosäurepositionen B12.2, G7.0 und HC11.2. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenz des *Spalax carmeli* (2n=58) Cygb-Gens aufgeklärt. In Kooperation mit Prof. Dr. A. Avivi (Institut für Evolution, Universität von Haifa, Israel) erfolgte die Sequenzierung von Cygb der anderen drei *Spalax*-Spezies. Sequenziert wurde im Fall des *Spalax carmeli* (2n=58) Cygb-Gens insgesamt ein Bereich von 7709 Bp (NCBI-Datenbank Zugangsnummer: AM489448, Sequenzen z. Zt. noch vertraulich in Datenbanken eingetragen). Der potenzielle Promotorbereich/5'UTR konnte aufgrund einer nicht funktionierenden 5'RACE-Reaktion nicht exakt definiert werden (Anmerkung: Im Folgenden wird daher von „Promotorbereich/5'UTR“ gesprochen). Der auf Genomebene isolierte Bereich stromaufwärts des Startcodons hat eine Länge von 1215 Bp. Der kodierende Bereich des Exons eins hat eine Länge von 144 Bp, Exon zwei von 230 Bp, Exon drei von 165 Bp und der kodierende Bereich von Exon vier von 34 Bp (Nukleotidsequenzalignment zwischen orthologen Genen siehe Anhang 3). Es konnte ein Bereich von 94 Bp stromabwärts des Stopcodons sequenziert werden, der nicht den kompletten 3'Bereich des Gens beinhaltet, da eine Klonierung dieses PCR Produktes nicht möglich war. Die direkte Sequenzierung dieser Region ergab eine sichere Sequenz von 94 Bp. Die Genstruktur inklusive repetitiver Elemente ist in Abbildung 3-10 gezeigt.

Das *Spalax carmeli* (2n=58) Cygb hat zu den orthologen Sequenzen aus Ratte, Maus, Mensch und Hund vorwiegend in den Exons Sequenzidentitäten von 80-85 %, wie im *Percent Identity Plot* (PIP) zu erkennen ist (Abbildung 3-10). Lediglich im Exon eins des Hundes gibt es kurze Bereiche mit einer Konservierung zwischen 75 und 90 % beim *Spalax*-Hund-Vergleich. Konservierte Regionen im potenziellen Promotorbereich/5'UTR zeigen Sequenzidentitäten im Bereich von 70-90 % bei einer durchschnittlichen, konservierten Länge von 15-30 Bp zwischen *Spalax* und den anderen untersuchten Mammaliern. Besonders stromaufwärts des Exons 1 gibt es Bereiche von maximal 100 Bp, die konservierte, potenziell transkriptionsregulatorische Elemente tragen. Die evolutionär weiter entfernten Spezies Hund und Mensch zeigen in diesem Bereich einen geringeren Grad an Sequenzkonservierung beim Vergleich zu *Spalax*.

E R G E B N I S S E

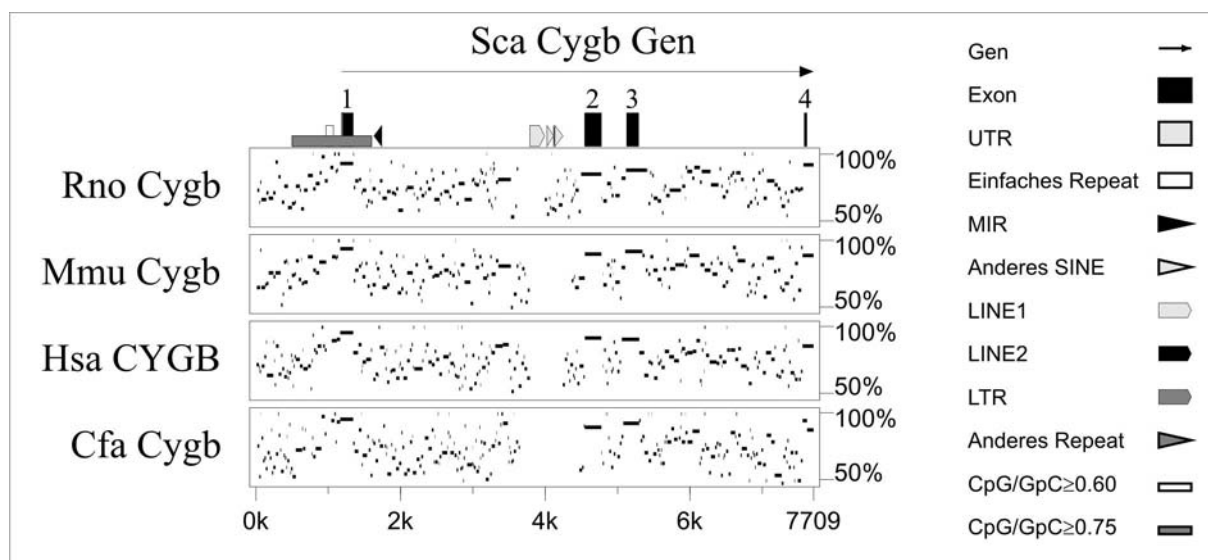


Abbildung 3-10: Sequenzvergleich des *Spalax carmeli* (2n=58) Cytoglobin Gens mit den orthologen Genen aus Ratte (Rno; *Rattus norvegicus*), Maus (Mmu; *Mus musculus*), Mensch (Hsa; *Homo sapiens*) und Hund (Cfa; *Canis familiaris*). Bei den Berechnungen handelt es sich nicht um einen multiplen Sequenzvergleich sondern um vier duale Vergleiche zwischen der *Spalax* Sequenz und den anderen Spezies. Die untranslatierten Regionen sind nicht eingezeichnet, da sie nicht exakt definiert werden konnten.

Überraschenderweise gibt es in Intron 1 an Cygb-Genposition 3250 Bp eine Region von ungefähr 235 Bp (Abbildung 3-10), die über 80 % Übereinstimmung zwischen *Spalax* und den orthologen intronischen Regionen der Ratte, Maus und Mensch haben (Abbildung 3-11 A). Der entsprechende Bereich zwischen *Spalax* und Hund ist nur 80 Bp lang, dafür aber zu 95 % konserviert. Der AT-Gehalt dieser Region in *Spalax* beträgt 42 %. Eine BlastX-Datenbanksuche am *NCBI* ergab keine signifikanten Suchergebnisse. Das gleiche Ergebnis wurde mit den Sequenzen der anderen Spezies erhalten. Die hochkonservierte Intron-Sequenz wurde zudem mit Hilfe von *ORFFinder* (http://bioinformatics.org/sms/orf_find.html) auf offene Leserahmen untersucht, was ein 70 Aminosäuren großes Peptid hervorbrachte. Eine Blast-Datenbanksuche hiermit ergab wiederum keine signifikanten Treffer. Die Suche nach Matrix assoziierten Bereichen mit Hilfe des *S/MAR search tool* (Genomatix, Rollini et al. 1999) war ebenfalls erfolglos.

Das Cygb-Gen von *Spalax carmeli* (2n=58) hat eine große CpG Insel von 1,1 kbp, welche die potenzielle Promotor Region, das Exon 1 und Teile des Intron 1 umfasst. Ein einfaches (CA)_n repetitives Element liegt im Promotor/5'UTR Bereich (103 Bp Länge). Dieses existiert auch in den anderen vier untersuchten Mammaliern, wenngleich in stark reduzierter Länge (Abbildung 3-11 B). Vier SINE Elemente wurden im Cygb-Gen von *Spalax* gefunden. Das erste ist ein konserviertes MIRb Element (109 Bp Länge) im 5' Bereich des ersten Introns, das auch in den anderen Spezies vorkommt, wobei die Ratte in diesem Element eine 50 Bp-

E R G E B N I S S E

Deletion aufweist. Die anderen drei SINEs (Alu5, B4, Alu2), die in Maus, Mensch und Hund nicht existieren, sind im 3' Bereich des Intron 1 lokalisiert, weisen jedoch eine geringe Ähnlichkeit zur Sequenz aus der Ratte auf. Die Mensch-Sequenz besitzt in diesem Bereich ebenfalls vier SINEs (AluJB, AluJo, 2xAluSx, Wystub et al. 2004). Weiterhin hat nur *Spalax* ein LINE1 Element (Lx8), das 5' stromaufwärts der Intron 1-SINEs liegt. Introns 2 und 3 des *Spalax carmeli* (2n=58) Cygbs besitzen keine repetitiven Elemente. Der Mensch – Maus Vergleich aus Wystub et al. (2004) zeigt jedoch, dass es zumindest im Intron 3 des Menschen ein MIR Element gibt.

A	3267	3277	3286	3296	3306	
3258:	GTGGAGGAGGAGGAAACTCTGCCTT	-AGGGTCTGAGGCAGACCCACACT				Sca_Cygb
4228:	C..AGTT..A..-----T.....A..A.....				-----TG--	Rno_Cygb
3821:A...CG.G.AGA.....				-----G.G--	Mmu_Cygb
4532:G..T.....GG.GT...T...-..A.C.....				-----	Hsa_CYGB
4758:	C...T..T..T.....AG...T...-G.....G..AC.....				-----T.--	Cfa_Cygb
	3316	3326	3336	3346	3352	
3307:	TCCTTCCACTCCCTGCCAGAGAGGAGCCTGAGAAGGGAACA	----	CCACC			Sca_Cygb
4390:	--T...T...A..T...A..A.....G.G.....G..TCGC.....					Rno_Cygb
3868:	--T..G.....A..T.....A.....G.....G.....				----C..C..	Mmu_Cygb
4579:	--.....T.....G.....A.C-.AG.....				----C.....	Hsa_CYGB
4805:	--.C.G.....				-----AG..GAG.....	Cfa_Cygb
	3360	3370	3380	3389		
3353:	CT-----CCCTCCTGGTTGTAACGCTGACACCTT	-----	CCCCCTCA			Sca_Cygb
4437:	.C-----				C..CA.....T.....G..-----	Rno_Cygb
3912:	.CCCCT-----				G.....T.....G..-----	Mmu_Cygb
4623:				G.....T.....T.....	Hsa_CYGB
4836:	..CTAGGAAGACTC.....				C.....T...C.....C.....	Cfa_Cygb
	3398	3408	3416	3426	3436	
3390:	CATTC-AGACAAGCCTATTT	CAGG--CTCTTGGAAGCCCAGATGCCTCTG				Sca_Cygb
4474:	..CA.-...TGG.....				-----A.....	Rno_Cygb
3954:	..CG.-...GG.....				G.....A.....	Mmu_Cygb
4660:	..C.-...G.....				CT.....	Hsa_CYGB
4886:	..C..A.....				CT..G.....	Cfa_Cygb
	3446	3456	3466	3476		
3437:	GGAGCTGAGAAACTCCCCAAGACTAGCTGCCGAGGCTCCTCCCCAG	----				Sca_Cygb
4521:	A.....				G.....TAG....T.....T..----	Rno_Cygb
4001:	A..A.....				G.....TTA....T.....T.A----	Mmu_Cygb
4709:				G.G..G...TG.....TG.----	Hsa_CYGB
4936:				G..G...T.....T.....T.CAGG	Cfa_Cygb
	3492	3500	3510			
3483:	-----CAGCTCAGGTCAA-----				-----CCTGGGTGTCTCAGG	Sca_Cygb
4567:	-----				AAC..G-----A...A.GGGTG..	Rno_Cygb
4047:	-----				A.C..G-----A...ATGGGTG..	Mmu_Cygb
4755:	-----				A...CTG.GAC-----GG.A.G.....	Hsa_CYGB
4986:	CAGCGCAGCA...A...C.CGGACCTGGAGGGT.GG.A...CTGGG.C					Cfa_Cygb

Legende siehe nächste Seite

E R G E B N I S S E

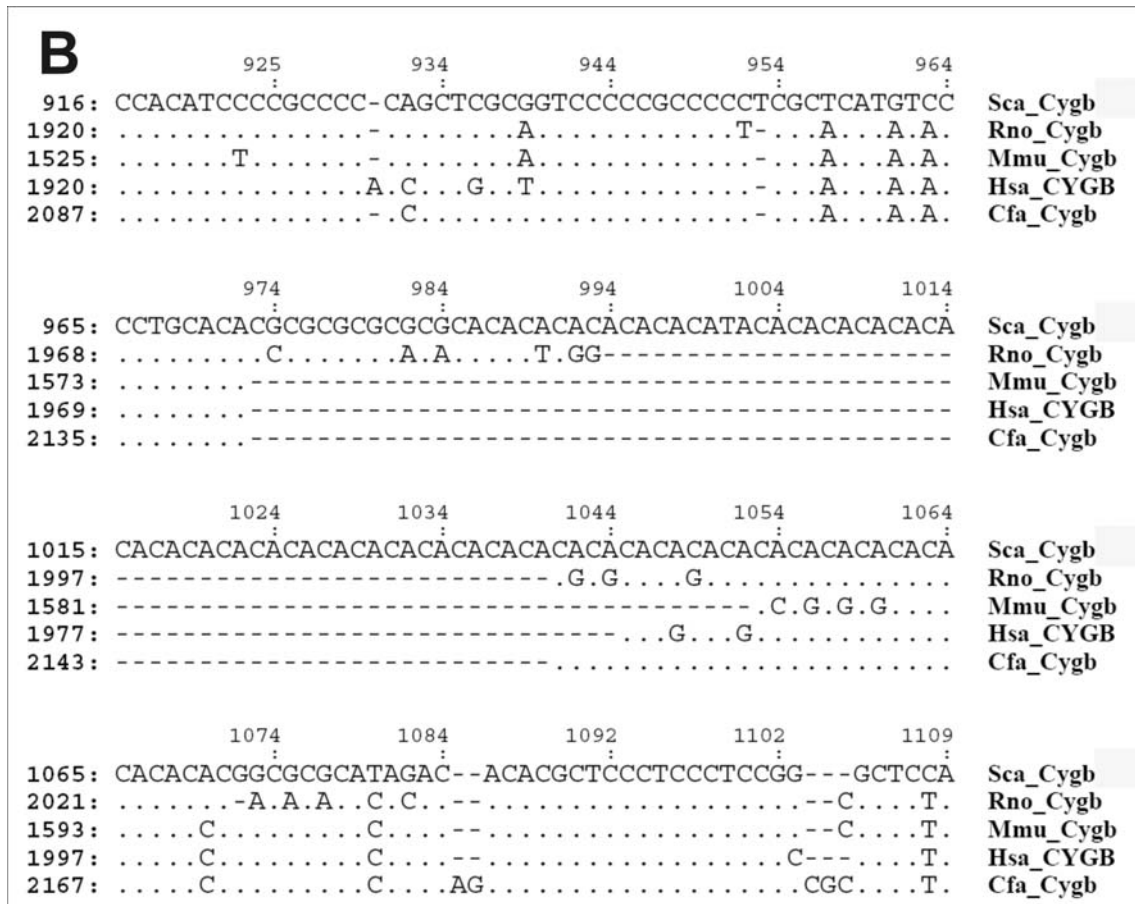


Abbildung 3-11: Nukleotid Sequenzvergleiche des *S. carmeli* (2n=58) Cytoglobingens mit den orthologen Sequenzen aus Ratte, Maus, Mensch und Hund (von oben nach unten). Dargestellt sind Sequenzen, die im Zuge der Erstellung des *Percent Identity Plots* (Abbildung 3-10) mit Hilfe des BlastZ-Algorithmus (Schwartz et al. 2000) erhalten wurden. Es handelt sich nicht um *multiple Alignments*, sondern um mehrfache duale Vergleiche mit der Referenzsequenz aus *Spalax*. Punkte im Sequenzvergleich bedeuten übereinstimmende Sequenz zur Referenzspezies, Bindestriche zeigen Lücken in der jeweiligen Sequenz an. (A) Bereich aus Cytoglobin Intron 1 mit hochkonservierten nicht-kodierenden Sequenzen. (B) *Spalax* spezifische CA-Sequenzwiederholung aus putativem Promotorbereich.

3.1.2.2.1 Zelluläres Expressionsmuster von *Cygb* in verschiedenen Geweben

Eine *Cygb*-Expression in *Spalax* konnte, wie auch in der Maus (Schmidt et al. 2004), in allen untersuchten Geweben gefunden werden. Im Gehirn zeigten Neurone distinkter Zellpopulationen sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma Immunreaktion (Abbildung 3-12 A-E). Cytoglobin Immunfärbung in der Leber, im Herzen, im Darm und in der Niere brachte hervor, dass das Protein v. a. im Zytoplasma von Fibroblasten sowie Fibroblastenverwandten Zelltypen vorkommt, wie u. a. den Sternzellen der Leber oder Myofibroblasten des Herzens (Abbildung 3-13). Die gewählte Nachweismethode mit einem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper zeigte auch unspezifische Signale in den Erythrozyten, die jedoch leicht an ihrer Form identifiziert werden konnten (Abbildung 3-13 D und E).

ERGEBNISSE

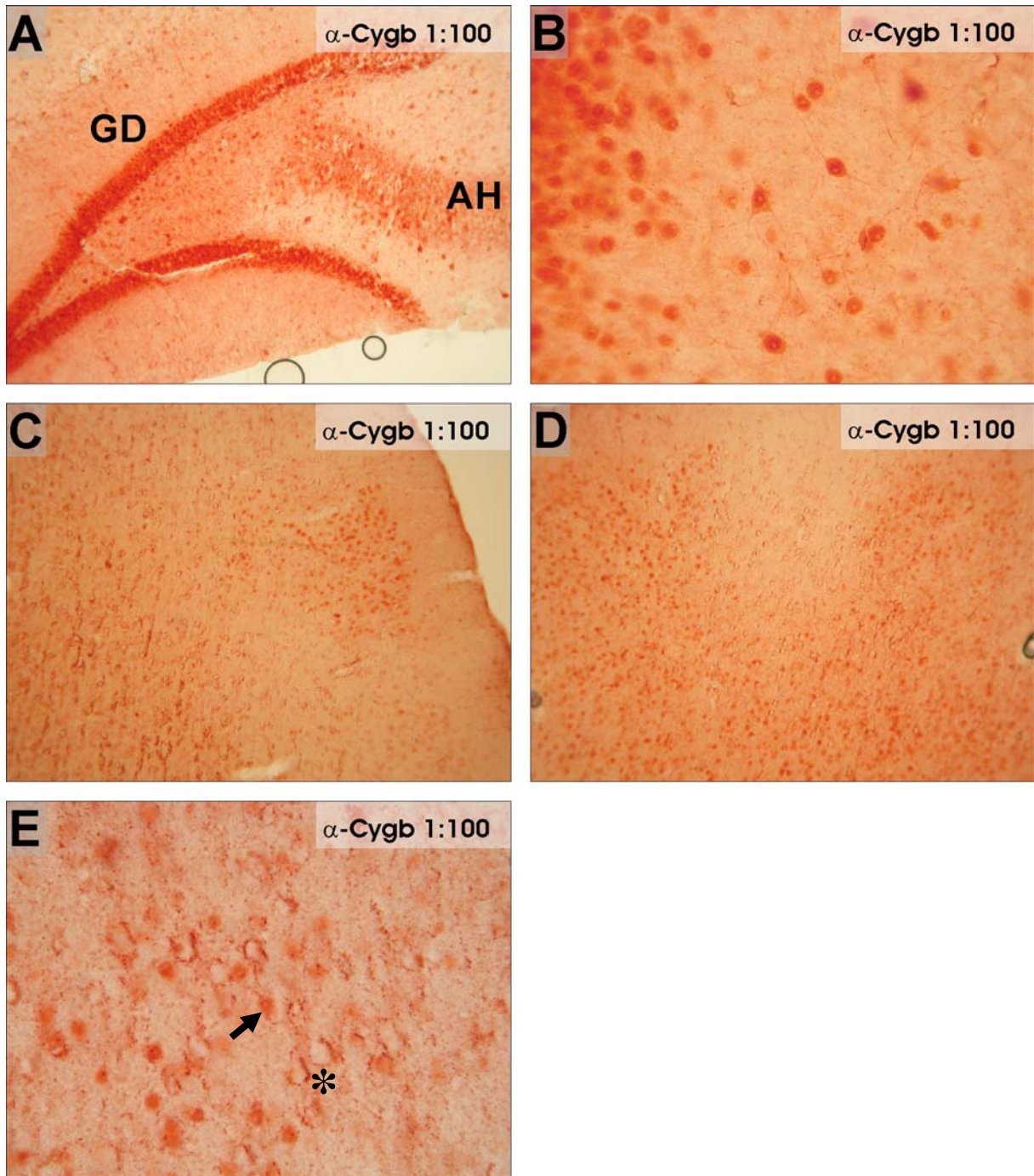


Abbildung 3-12: Immunhistochemischer Nachweis der Cygb Expression im Gehirn von *S. golani* ($2n=54$). Die Hauptexpressionsorte unterschieden sich nicht sichtbar zwischen Maus und Ratte. Der Antikörper HsCygb2-M (vgl. 2.8) wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. A, B. Cygb-Expression im Gehirn. Abb. (A) zeigt einen Frontalschnitt durch die Region des Gyrus dentatus (GD) und des Ammonshorns (AH). In Abb. (B) erkennt man sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Färbung der neuronalen Zellen. Zellfortsätze sind ebenfalls gefärbt. (C, D und E) zeigen, dass distinkte Zellpopulationen gefärbt sind und dass Zellen teilweise nukleäre und zytoplasmatische Färbung aufweisen (E, Pfeil), andere jedoch nur zytoplasmatische Signale (E, Stern).

ERGEBNISSE

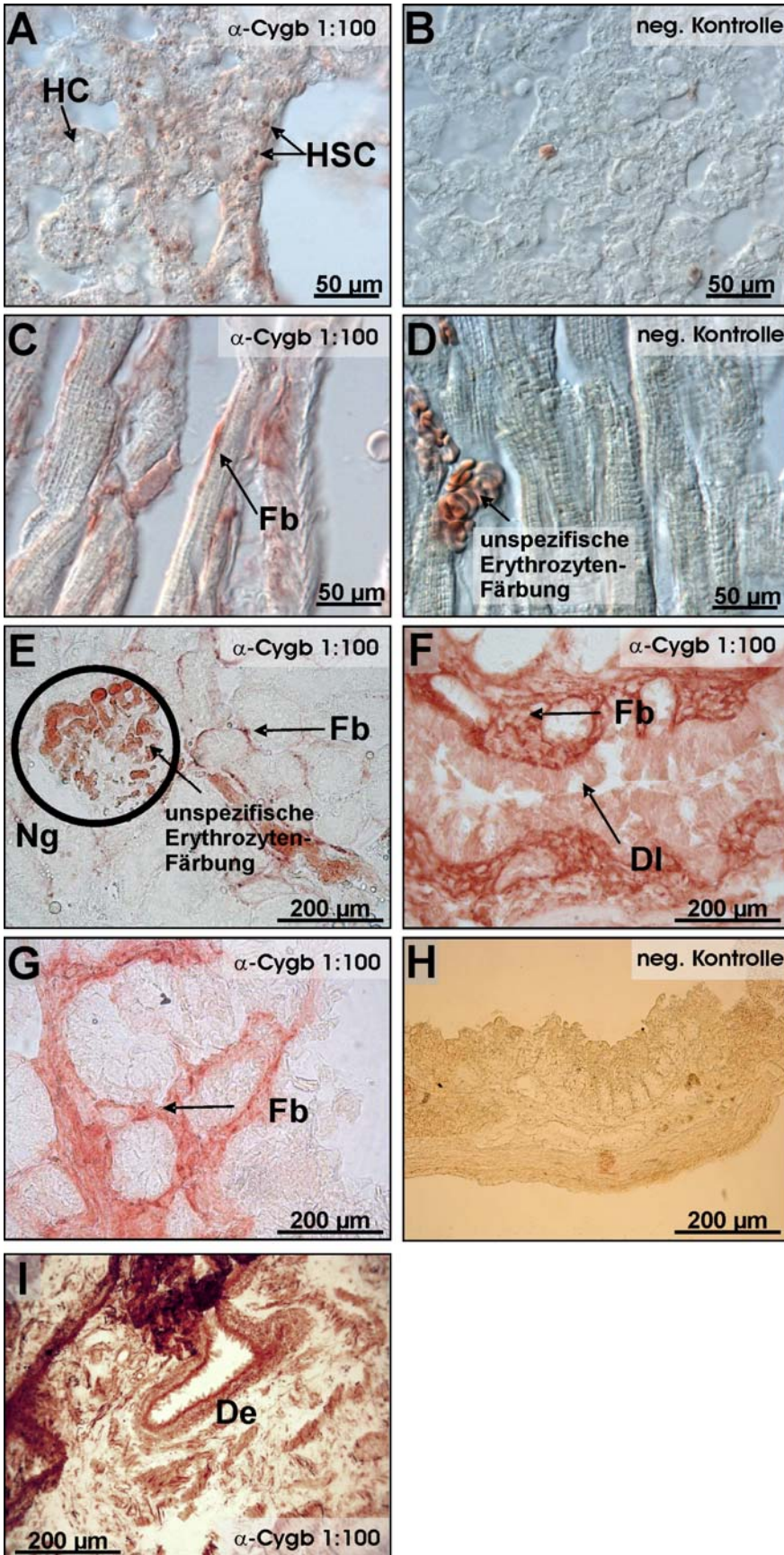


Abbildung 3-13: (A, B) Cygb-Immunreaktion in der Leber. (A) Lediglich die winzigen Sternzellen der Leber (HSC *hepatic stellate cells*), ein Fibroblasten-verwandter Zelltyp, sind gefärbt, die Hepatozyten (HC, *hepatocytes*) zeigen keine Färbung. (B) Die Negativkontrolle zeigt keine Anfärbung der HSCs. (C, D) Cygb-Immunreaktion im Herzmuskel. Eine klare Färbung der (Myo-) Fibroblasten (Fb) ist in (C) zu erkennen. (D) Die Kontrolle ohne Erstantikörper zeigt lediglich unspezifisch gefärbte Erythrozyten, die in der Niere (E) mit dem spezifischen Signal verwechselt werden können. Auch hier sind Fibroblasten angefärbt, der Nierenglomerulus (Ng) hingegen nicht. Im Darm (F, G, H) sind in der quergestreiften Muskulatur Fibroblasten stark gefärbt, die Darmzotten, die in Richtung Darminnerem (DI) zeigen, selbst nicht. Die Negativkontrolle des Darms zeigt keinerlei Färbung (H). (I) zeigt Färbung in den inneren Schichten des Ductus efferens (De) des Hoden.

3.1.2.3 *Quantitative Untersuchung der Cytoglobin mRNA-Expression*

Die relative Expressionsstärke des Cytoglobingens wurde in der Ratte, *S. judaei* (2n=60) und in *S. galili* (2n=52) untersucht (Abbildung 3-14 A, B und C). Dazu wurden jeweils die Gewebe Gehirn, Herz und Leber der drei Spezies zwischenartiglich verglichen und die Cygb-Expression unter Hypoxie analysiert. Auf einen exakten quantitativen Vergleich zwischen Geweben wurde verzichtet, da RNAs unterschiedlicher Gewebe eines einzelnen Tieres (vielmehr als RNAs gleicher Gewebe unterschiedlicher Individuen oder auch Spezies) verschiedene Mengen intrinsischer reverse Transkriptase-Inhibitoren beinhalten.

Interspezies-Vergleich Cytoglobin bei Normoxie: Beim Vergleich der normoxischen mRNA-Expressionsniveaus des Cygb-Gens zwischen Ratte und den beiden *Spalax*-Arten *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52), ergab sich im Gehirn von *S. galili* (2n=52) eine signifikant stärkere Expression um den Faktor 2,7 gegenüber der Ratte ($p < 0,05$; Abbildung 3-14 A). Im Herzen der beiden *Spalax*-Spezies lag die Expression nur um ca. Faktor 1,3 höher als in der Ratte (Abbildung 3-14 B). In diesem Fall unterschieden sich die beiden Spezies nicht signifikant. Die Leber aller drei untersuchten Spezies exprimierten Cygb in etwa gleich stark (Abbildung 3-14 C). Auch hier waren die Mittelwerte der Expression nicht signifikant verschieden. Der Gewebevergleich zwischen Gehirn, Herz und Leber aller untersuchten Spezies hat gezeigt, dass im Gehirn die stärkste mRNA-Expression vorlag, gefolgt von der mRNA Menge im Herzen (ca. Faktor zwei weniger) und einer ca. 10-fach geringeren Cygb-mRNA Menge in der Leber (verglichen mit dem Gehirn) (Daten nicht gezeigt).

Regulation unter hypoxischem Stress im Gehirn (Abbildung 3-14 A): Beim Betrachten der hypoxischen Zustände im Gehirn der Ratte ergaben sich für die Cygb mRNA-Expression nur geringe Abweichungen vom normoxischen Wert. Die stärkste Abweichung vom Normalwert war nach 5 h bei 6 % O₂ zu beobachten. Unter dieser Sauerstoffbedingung war eine Herunterregulation auf einen Wert von etwa 50 % zu erkennen. Milde Hypoxie (10 % O₂) verstärkte die Expression nach 22 h nur leicht um einen Faktor von 1,3, verglichen mit der Normoxie, nach 44 h lag sie wieder beim normoxischen Wert. In *S. judaei* (2n=60) war nach 22- und 44-stündiger Hypoxie bei 10 % O₂ eine Hochregulation des Cygb-Gens um das 1,7- bis 2-fache des normoxischen Wertes erkennbar. Starke Hypoxie von 10 % für 5 h veränderte die Expression hingegen nicht. *S. galili* (2n=52) zeigte nach 5 h eine leicht geringere Expression von 80 % des normoxischen Wertes. Milde Hypoxie (10 % O₂) für 22 h beeinflusste die Cygb mRNA-Expression im Gehirn nicht. 44-stündige Hypoxie bei 10 % O₂

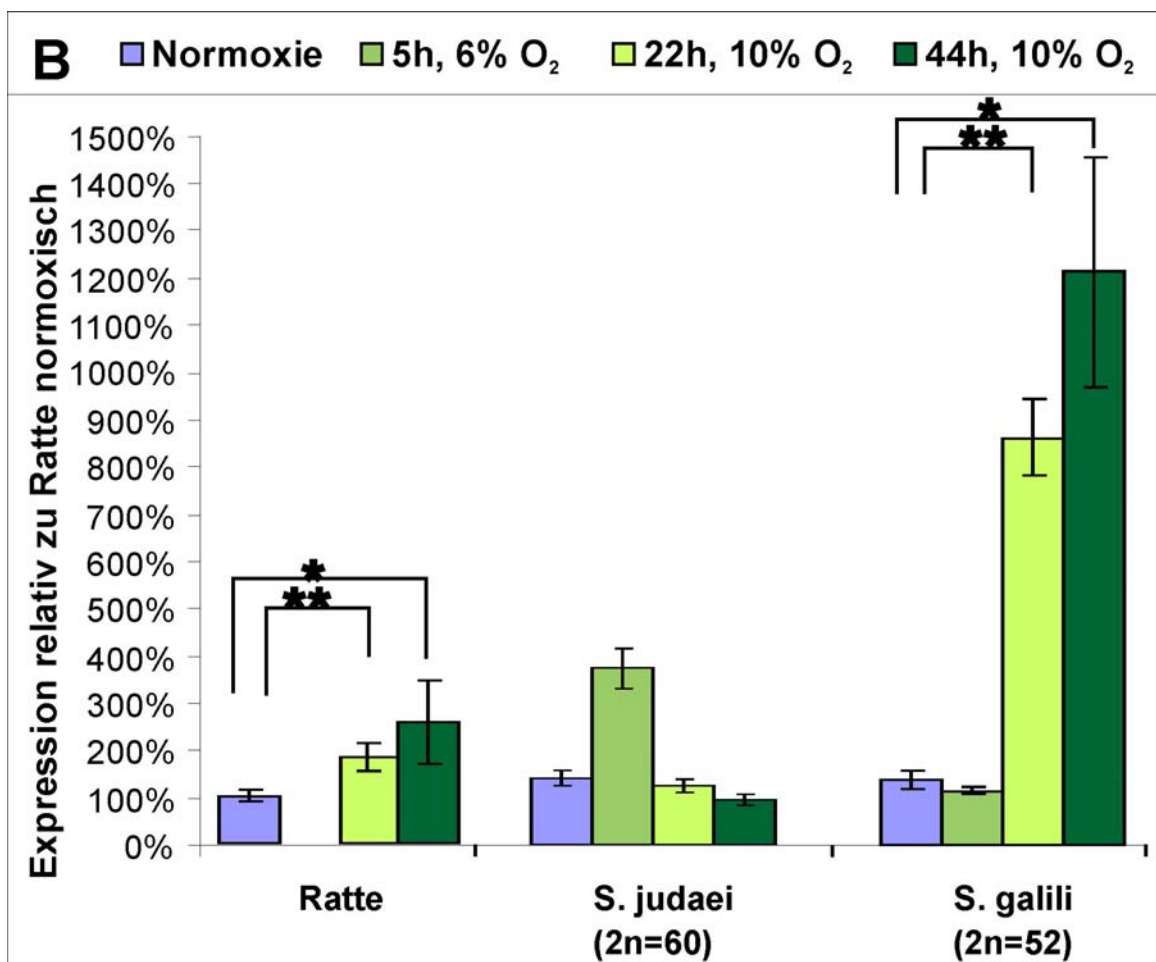
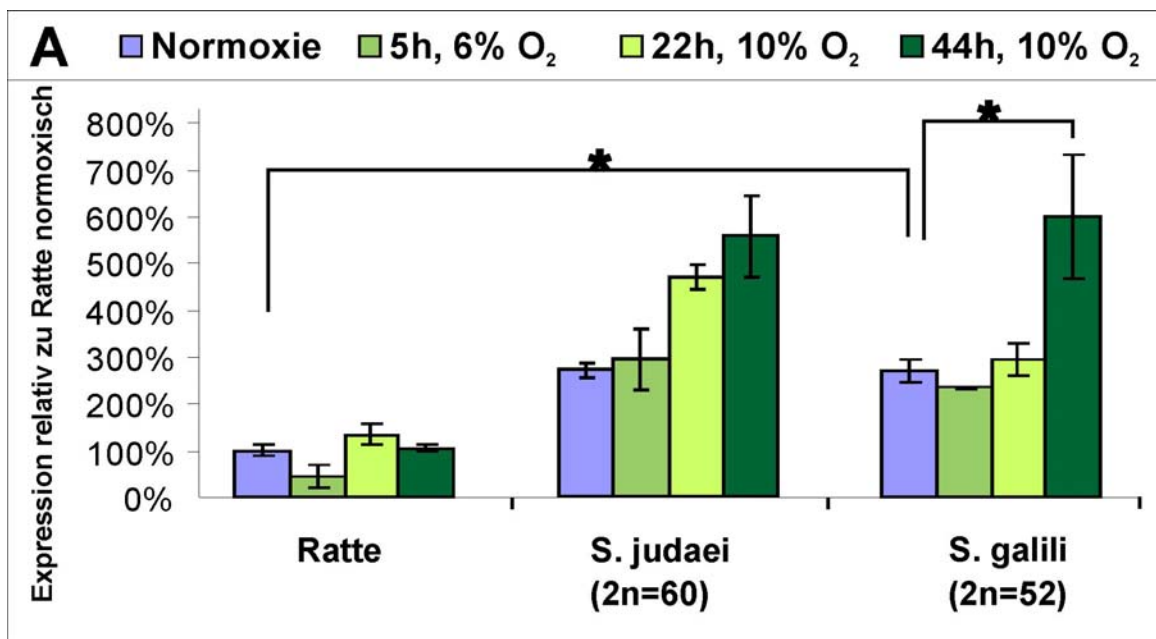
ERGEBNISSE

sorgte für eine signifikant verstärkte Expression um Faktor zwei ($p < 0,05$), beim Vergleich mit dem normoxischen Wert von *S. galili* ($2n=52$).

Regulation unter hypoxischem Stress im Herzmuskel (Abbildung 3-14 B): Das Herz der Ratte zeigte nach einer länger anhaltenden Hypoxie eine signifikant höhere Expression um den Faktor 1,8 nach 22 h 10 % O₂ ($p < 0,05$) und nach 44 h um den Faktor 2,5 ($p < 0,01$). Die Proben 5 h bei 6 % waren ausgefallen und der Versuch konnte nicht wiederholt werden. Die Expression von *Cygb* bei *S. judaei* ($2n=60$) stieg nach 5 h bei 6 % O₂ auf 380 % an und zeigte nach 22 bzw. 44 h eine geringe Herunterregulation auf ca. 90 bzw. 70 %, ausgehend vom normoxischen Wert. Im Herzen von *S. galili* ($2n=52$) war die *Cygb*-Expression nach 5-stündigem Sauerstoffmangel bei 6 % leicht abgesenkt auf 90 % des Normalwertes. Bei 10 % Sauerstoffkonzentration für eine Dauer von 22 bzw. 44 Stunden zeigte das Herz von *S. galili* ($2n=52$) eine starke Hochregulation um den Faktor 8 bzw. 12. Der *Studentsche* t-Test ergab eine Signifikanz auf dem $p < 0,01$ -Level für 22 h und $p < 0,05$ -Level für die Proben, die nach 44-stündiger Hypoxie entnommen wurden.

Regulation von *Cygb* unter hypoxischem Stress in der Leber (Abbildung 3-14 C): Die *Cygb*-Expression in der Leber stieg in der Ratte bei 10 %iger Sauerstoffkonzentration nach 22 und 44 h auf Faktor zwei an. Beide Expressionswerte unterschieden sich dabei signifikant vom normoxischen Wert ($p < 0,01$ für den 22 h-Wert, $p < 0,05$ nach 44 h). Die Proben, in denen starke Hypoxie von 5 % O₂ für 6 h getestet wurde, waren ausgefallen. *S. judaei* ($2n=60$) zeigte nach 5 h bei 6 % O₂-Konzentration eine Herunterregulation auf 70 % des Wertes bei normalen Sauerstoffbedingungen von 21 %. Nach 22 h bei 10 % O₂ ergab sich eine *Cygb* mRNA-Konzentration, die bei Faktor 1,4 des normoxischen Wertes lag. Nach 44 h sank die Expression jedoch auf einen Wert von nur 20 % der Ausgangsexpression unter normalen Sauerstoffbedingungen ab. Milde Langzeithypoxie ergab in *S. galili* ($2n=52$) eine verstärkte Expression um Faktor 1,7 sowohl nach 22 als auch nach 44 h.

ERGEBNISSE



Legende siehe nächste Seite.

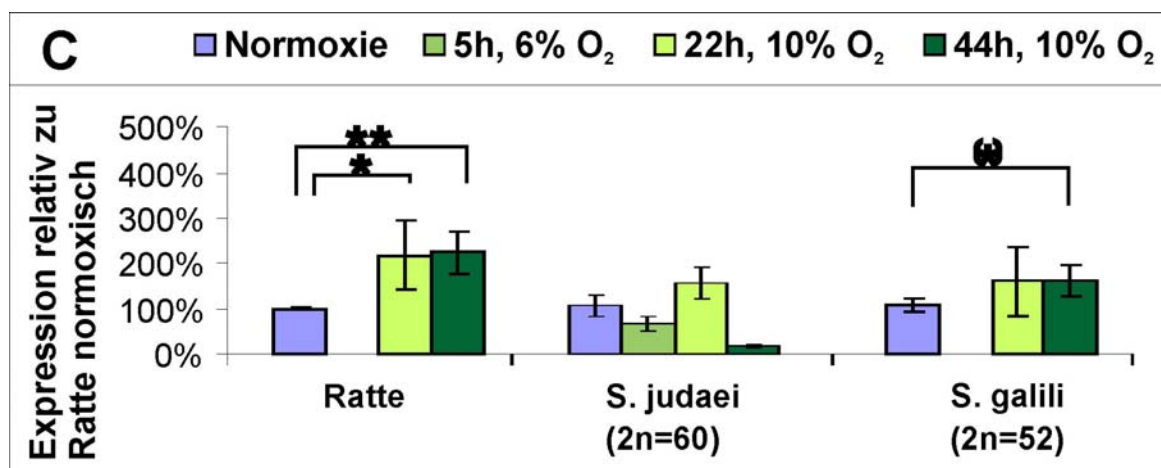


Abbildung 3-14: Cytoglobin Expression in Gehirn (A), Herz (B) und Leber (C) von Ratte, *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52). Untersucht wurde starke Hypoxie von 6 % für 5 h sowie moderate längerfristige Hypoxie von 10 % Sauerstoff für 22 und 44 h. Die Abbildung zeigt auch den interspeziesvergleich. Für die Bestimmung der Cygb-Expression wurden mindestens zwei Pools aus jeweils zwei bis vier Tieren untersucht (n=2). Signifikanzen wurden mit Hilfe des *Studentschen t*-Tests bestimmt (*) p<0,1; * p<0,05; ** p<0,01. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Alle Werte innerhalb einer Abbildung sind bezogen auf die normoxische Expression des jeweiligen Gewebes der Ratte. Fehlende Werte bedeuten, dass die entsprechenden Proben aufgrund technischer Probleme ausgefallen sind und die entsprechenden Hypoxieversuche nicht wiederholt werden konnten.

3.1.2.4 Quantitative Untersuchung der Cytoglobin Protein-Expression

Interspeziesvergleich. Die Expression des Cytoglobin Proteins wurde in Gehirnen von Ratten, *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) durchgeführt. Der Vergleich der normoxisch gehaltenen Tiere auf einem Western Blot mit dem anti-Cygb-V-Antikörper (vgl. 2.8) ist in Abbildung 3-15 gezeigt. Man kann erkennen, dass im Durchschnitt aller getesteten Tiere das Rattengehirn auf Proteinebene eine um ca. Faktor 2 niedrigere Cygb-Expression zeigte als beide *Spalax*-Spezies. Dieses Ergebnis korrelierte mit den auf mRNA-Ebene erhaltenen Werten (vgl. 3.1.2.3). Im Einzelfall gab es jedoch deutliche individuelle Abweichungen: So exprimierte Ratte 2 Cytoglobin ebenso stark wie *S. judaei* (2n=60) Tier 1 und 3 und auch wie Tier 3 der Spezies *S. galili* (2n=52). Tiere 1 und 2 der Art *S. galili* (2n=52) sowie *S. judaei* (2n=60) Tier 2 zeigten die stärkste Cygb Expression im Gehirn. Einflüsse der Sequenzunterschiede der drei Spezies auf die Antikörperbindung waren nicht zu erwarten, da im Bereich des aus 15 AS bestehenden Epitops keine Sequenzunterschiede zwischen Peptid (vgl. Tabelle 2-2), Ratte (vgl. NCBI-Datenbankeintrag NP_570100) und den beiden *Spalax*-Spezies (vgl. Proteinsequenz übersetzt aus AM419203 für *S. galili* (2n=52) und AM419204 für *S. judaei* (2n=60)) vorhanden waren.

ERGEBNISSE

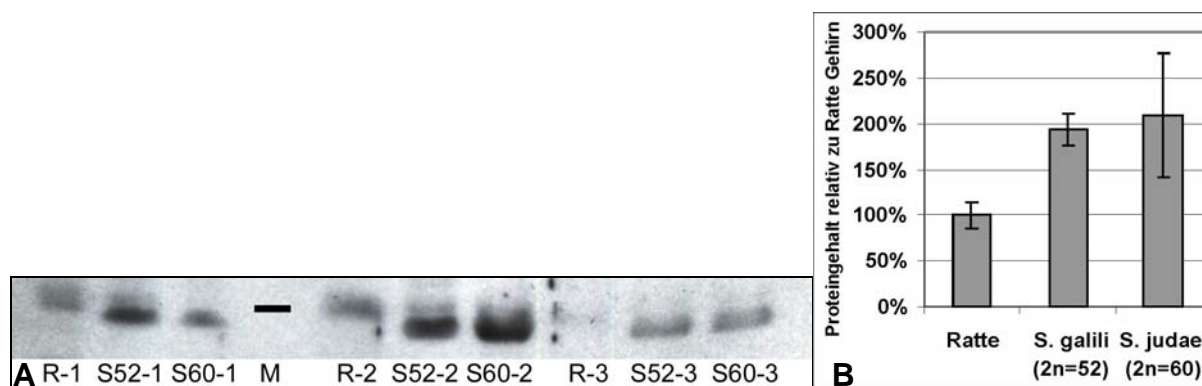


Abbildung 3-15: (A) Western Blot Analyse des Cygb Proteins in drei Gehirnen von Ratte, *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52). Die Tiere wurden unter normoxischen Bedingungen gehalten. Die Markerbande entspricht einer Größe von 24kDa. (B) Auswertung des Western Blots mit Hilfe der Software AIDA Ver. 3.50 (Raytest Isotopenmessgeräte): Der mittlere Cygb-Proteingehalt aller Individuen einer Art wurde bestimmt, wobei der Mittelwert der Ratte gleich 100 % gesetzt wurde. Die Werte der beiden *Spalax*-Spezies wurden auf die Proteinmenge der Ratte bezogen.

Hypoxie. Mit denselben Proben, welche für Hypoxieuntersuchungen von Neuroglobin verwendet wurden (vgl. Abbildung 3-7), ist ein Western Blot mit verschiedenen Antikörpern gegen Cytoglobin durchgeführt worden. Trotz wiederholter Versuche hat dieser Western Blot nicht funktioniert.

3.1.3 Das *Spalax* Myoglobin (Mb) Gen

3.1.3.1 Isolierung und Klonierung des Mb-Gens aus *S. carmeli* (2n=58)

Die Isolierung der CDS des *Spalax* Myoglobingens erfolgte mittels RT-PCR unter Verwendung zwei- bzw. einfach degenerierter Primer, deren Sequenzen anhand der Mb-Gen-Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte designt wurden und zusammen die komplette CDS definieren (*Forward-Primer: HMR Myo CDS deg for* und *Reverse-Primer: HMR Myo CDS deg rev*). Das erhaltene PCR-Produkt ist in Abbildung 3-16 (rechts) dargestellt und hat erwartungsgemäß eine Größe von knapp unter 500 Bp. Die Sequenzierung des Fragmentes ergab, dass die kodierende Sequenz des *Spalax* Myoglobingens aus 462 Bp besteht (Nukleotidalignment der kodierenden Bereiche der orthologen Myoglobingene siehe Anhang 4).

Eine 3'RACE Reaktion wurde durchgeführt, um das Transkriptende des *Spalax* Mb-Gens zu bestimmen (vgl. 2.2.2). Dazu wurden für die beiden aufeinander folgenden PCRs die Primer *HMR Myo CDS deg for* und *QPCR Myo deg for*, jeweils in Kombination mit dem vom Hersteller angegebenen Primer *AUAP*, verwendet. Die beiden Produkte der ersten sowie der

ERGEBNISSE

nested PCR sind ebenfalls in Abbildung 3-16 gezeigt. Die Größe des ersten PCR-Produktes betrug in etwa 950 Bp, die des zweiten (*nested*) Produktes ca. 700 Bp. Für den 3' untranslatierten Bereich ergab sich somit eine Größe von 485 Bp.

Um das 5' Ende der *S. carmeli* (2n=58) Mb-cDNA zu bestimmen, wurde eine 5'RACE-Reaktion entsprechend 2.2.1 durchgeführt. Zur reversen Transkription der Gesamt-RNA wurde der Primer *HMR Myo CDS deg rev* verwendet. Die erste PCR erfolgte mit dem genspezifischen Primer *QPCR Myo deg rev* und dem im Kit mitgelieferten *AAP*. Da nach dieser PCR noch kein Produkt vorhanden war, wurden für die *nested* PCR die Primer *S58 Myo 5'RACE rev* und *AUAP* (Invitrogen) verwendet. Das Gelfoto dieser PCR ist in Abbildung 3-17 gezeigt. Der isolierte 5'UTR hatte eine Länge von 60 Bp. Alle PCRs, die der Bestimmung der Mb-Sequenz dienen, wurden mit der *Accuprime Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) durchgeführt (vgl. 2.1.4). Die erhaltene *S. carmeli* (2n=58) cDNA-Sequenz hat eine Gesamtlänge von 1007 Bp und wurde veröffentlicht unter der NCBI-Zugangsnummer AM419205 (Abbildung 3-18). Ob es sich beim 5'UTR um die komplette Sequenz handelt, ist unklar. Es könnte jedoch noch einen weiteren Transkriptionsstart geben, da man auf dem Gelfoto der 5'RACE-nested PCR noch eine zweite, schwächere Bande im Bereich von knapp 600 Bp erkennen kann. Eine genauere Betrachtung dieses Bereiches brachte jedoch keine Aufklärung, da diese nur schwach amplifizierte Bande nicht kloniert werden konnte. Der 3' untranslatierte Bereich des Mb-Gens aus *S. carmeli* (2n=58) hingegen konnte vollständig inklusive des Poly-A-Endes isoliert werden.

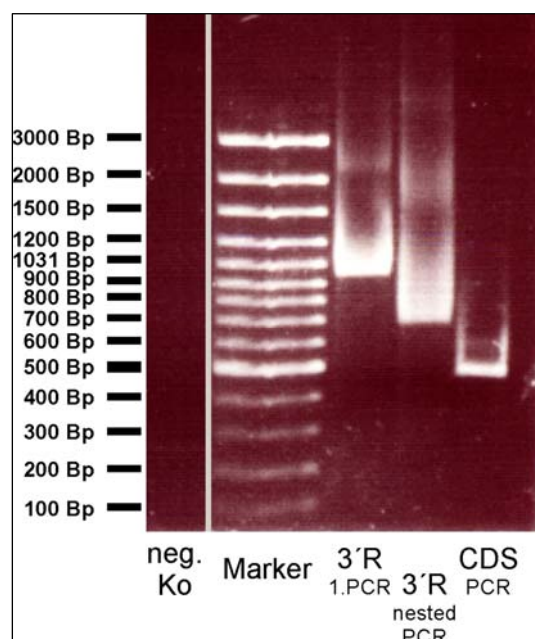


Abbildung 3-16: Agarosegel der PCR des *S. carmeli* (2n=58) Myoglobingens. Von links nach rechts sind die Negativkontrolle der PCR mit den CDS-flankierenden Primern (neg. Ko), ein 100 Bp-Marker (*GeneRuler 100 Bp DNA Ladder Plus*, Fermentas), das 1. (3'R, 1.PCR) sowie das *nested* PCR-Produkt (3'R, nested PCR) der 3'RACE (vgl. 2.2.2). Auf der rechten Seite ist das PCR-Produkt aufgetragen, welches mit degenerierten Primern aus Mensch, Maus und Ratte erstellt wurde.

E R G E B N I S S E

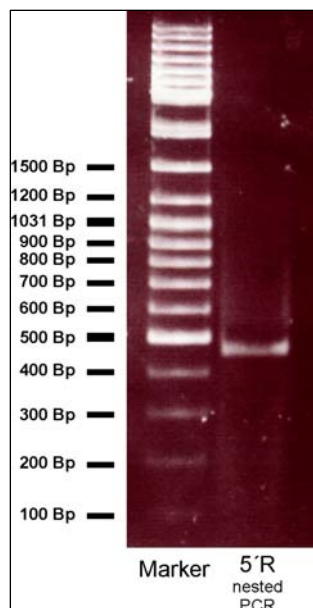


Abbildung 3-17: Agarosegel der 5'RACE nested PCR des Myoglobins aus *S. carmeli* (2n=58). Als Molekulargewichts-Standard ist eine 100 Bp – Leiter (*Gene Ruler DNA Ladder Mix*, Fermentas) aufgetragen.

```

TAAAAACCTC AGCTGACTGC CGGCCACGC TCGATCTCTT TGTCTCCTC AGAAGCTACC 60
HMR Myo CDS deg For Y Y
ATGGGACTCA GCGACGGGGA ATGGCAGCTG GTGCTGAAGG TCTGGGGGAA GGTGGAATCC 120
GACCTTGCTG GCCATGGGCA GGAAGTCCTT ATCAAGTTGT TTAAAAATCA CCCCAGAGACC 180
TTGGAGAAGT TTGACAAGTT CAAGAACCTG AAGTCGGAGG ATGAGATGAA GGGCTCGGAG 240
GACCTGAAGA AGCATGGCAA CACTGTGCTC ACGGCCCTGG GGGGCATCCT GAAGAAGAAA 300
GGGCAGCACG CTGCAGAGAT CCAGCCCCTG GCCCAGTCAC ATGCCACCAA GCACAAGATC... 360
.....> CCCATCAAGT ACCTGGAGTT CATCTCGGAA GCCATCATCC <----- QPCR Myo deg For
S58 Myo 5'RACE Rev
CCCGGAGACT TTGGTGCAGA TGCCAGGGC GCCATGAGCA <----- QPCR Myo deg rev C 480
AATGACATTG CTGCCAAGTA CAAGGAGCTG GGCTTCCAGG GCTAGGCTTG CCACACGGCC 540
AGCACCAGCC CACCAAGCCR GGCCCAACAT CGTCGTGTAG CTAGTAGAGT GTGCAGTGTC 600
TTAGGTTAGC AGAGGGACAG AAGAGAGGAG CGTAGGGTGG CATCCAGCAT CCACACACCT 660
GAGGACAGGG CTCCAGGTGG CGTCACCATG GGACCCAGAG GTGCAAAGTG GTCTCTGCTT 720
CCATTGCTCT ATTGAGTCGT CCTCAGGTCT CCTGTCACTT AAGTCCCGAC CCACTTCTCTC 780
CTGGTTTCCA GGAAGACCCC TTCCTCCACT ATTACCTTTG ACCACAAATC CAAGTCACTG 840
ACTACCAGAC CCAGACCTTT GAATGCGGTA GAGGGTGCA TAGCATGAGT GGCTGTCAGA 900
GGGAGGCCAC TGGGCATCTG GAAGTCACCT GCCACTCGGG TACCCACTGA CTCACCTGGT 960
TTCAATAAAA GACCCTGTGA CTCCTCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAA 1007
    
```

Abbildung 3-18: Sequenz der *S. carmeli* (2n=58) Myoglobin cDNA. Dargestellt ist der 5'UTR, gefolgt von der kodierenden Sequenz (Fettdruck), beginnend mit dem Startkodon (grüner Hintergrund) und endend mit dem Stoppkodon (roter Hintergrund). Danach ist der vollständige 3'UTR inklusive Polyadenylierungssignal (hellblauer Hintergrund) und Poly-A Schwanz gezeigt.

ERGEBNISSE

Die Translation der Mb Sequenz aus *S. carmeli* (2n=58) zeigte, dass diese selbst erstellte Sequenz drei Aminosäuresubstitutionen zu der schon in der Datenbank (P04248) vorhandenen Proteinsequenz besitzt. In der begleitenden Veröffentlichung zu diesem Datenbankeintrag wird lediglich der Name der Superspezies *Spalax ehrenbergi* genannt. Hieraus wird ersichtlich, dass die Mb-Sequenz im Datenbankeintrag aus einer der drei anderen *Spalax*-Spezies stammen muss.

3.1.3.2 Expression des Myoglobingens auf mRNA-Ebene im Skelett- und Herzmuskel

Die Expression des Mb-Gens wurde im Nacken-Skelettmuskel und im Herzen von Ratte, *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) untersucht. Abbildung 3-19 A zeigt zunächst die Expression von Myoglobin (Mb) im Skelettmuskel. Hierbei ist zu erkennen, dass *S. judaei* (2n=60) eine um Faktor 27, *S. galili* (2n=52) eine um Faktor 42 höhere Mb Expression als die Ratte aufwies. Entsprechend lag der Expressionsunterschied zwischen *S. galili* (2n=52) und *S. judaei* (2n=60) bei ca. Faktor 1,6. Die Expression von Mb unter Hypoxie ist in Abbildung 3-19 B dargestellt. Eine kurze starke Hypoxie von 5 h bei 6 % Sauerstoff bewirkte in der Ratte eine stärkere Expression des Mb-Gens um Faktor 2,74 verglichen mit Normoxie, wohingegen die Expression in beiden *Spalax*-Spezies kaum verändert wurde. Nach 22-stündiger milder Hypoxie bei 10 % O₂ ergab sich eine starke Herunterregulation auf einen Wert von 13,2 % bei Ratte und 1,79 % bei *S. judaei* (2n=60). In *S. galili* (2n=52) jedoch wurde die Expression zunächst nur unwesentlich verändert. 44-stündige Hypoxie bei 10 % O₂ führte in der Ratte zu einer Herunterregulation auf 23 % des normoxischen Wertes. In *S. judaei* (2n=60) blieb die Expression mit 2,08 % in etwa auf dem Niveau von 22 h.

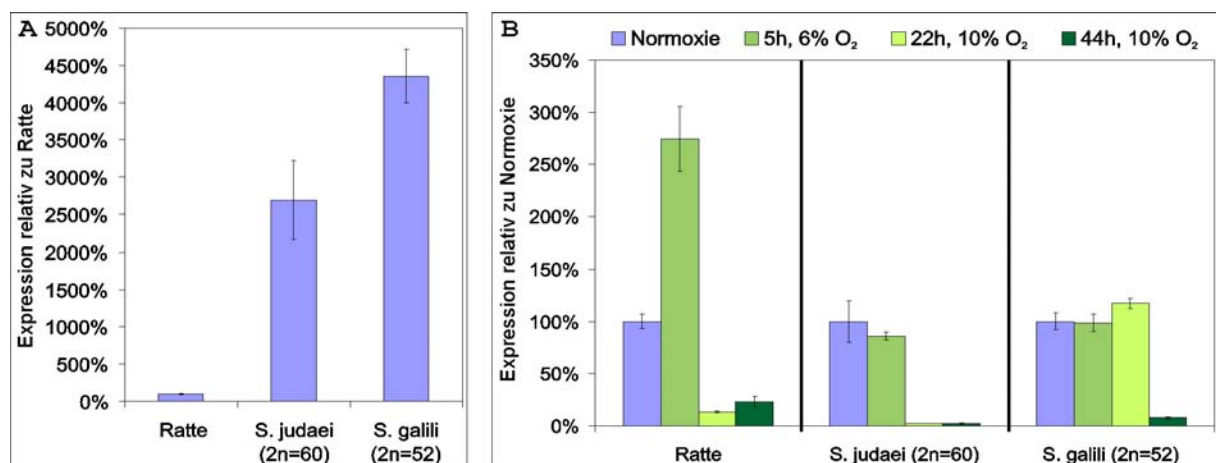


Abbildung 3-19: Expression der Myoglobin mRNA im Nacken-Skelettmuskel relativ zum Gesamt-RNA-Gehalt der Proben. (A) Expression von Myoglobin im normoxischen Vergleich zwischen Ratte, *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52). (B) Expression von Myoglobin in Ratte, *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) nach unterschiedlichen Hypoxiezuständen. Die normoxischen Levels zwischen den Arten können in Abbildung B nicht miteinander verglichen werden, sondern sind ausschließlich in Abb. A dargestellt.

ERGEBNISSE

Bei Myoglobin im Herzen (Abbildung 3-20) zeigte sich für den Interspeziesunterschied ein Faktor von ca. 2,7, um den die Expression in *Spalax* höher war als in Ratte. Zwischen *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) konnte in diesem Fall nicht unterschieden werden, da nur eine gepoolte, normoxische RNA aus beiden Spezies vorlag. Langzeithypoxie von 22 oder 44 h führte in der Ratte zu einer erhöhten Expression um Faktor 1,6-1,7, in *S. galili* (2n=52) stieg sie nach beiden Zeitpunkten auf das 1,4 fache an. *S. judaei* (2n=60) regulierte die Mb mRNA im Herzen nach 22 h auf das 1,5-fache des normoxischen Wertes hoch. Nach 44 h jedoch sank die Expression auf 59 %, bezogen auf die Normoxie.

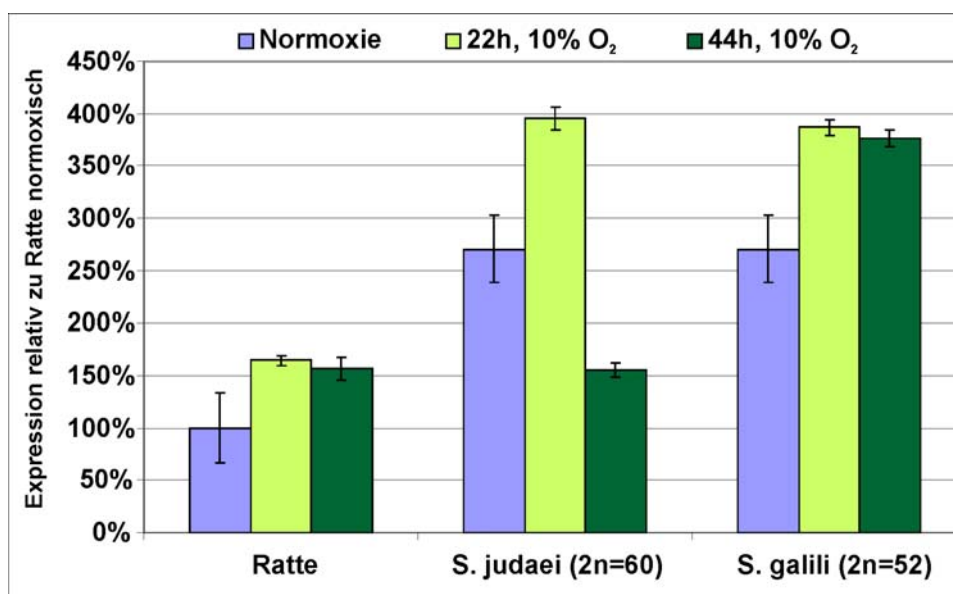


Abbildung 3-20: Myoglobin mRNA-Expression im Herzen von Ratte, *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52). Untersucht wurden normoxisch gehaltene Tiere sowie Tiere, die 22- und 44-stündiger Hypoxie ausgesetzt waren. Ein normoxischer Vergleich zwischen *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) ist nicht zulässig, da es sich um normoxische Proben handelte, in denen RNA beider *Spalax*-Spezies 1:1 vermischt wurden. Ein getrenntes Versenden der RNAs beider Proben war für die Kooperationspartner aus Israel (Prof. Dr. A. Avivi) nicht möglich.

3.1.4 Neuroglobin und Cytoglobin im Auge von *Spalax*

3.1.4.1 Expressionsmuster der Proteine Ngb und Cytochrom c in der *Spalax*-Retina

Die Expression von Neuroglobin fand vornehmlich in der Ganglienzellschicht (GZS, Abbildung 3-21) der *Spalax*-Retina statt, gefolgt von schwächerer Expression in der inneren nukleären Schicht (INS). Die ÄNS zeigte nur leichte Ngb-Expression. In einigen Schnitten exprimierte die äußere plexiforme Schicht (ÄPS) Ngb (Abbildung 3-21 A und B), in anderen nicht (Abbildung 3-21 C-F). Wiederholte Versuche konnten diesen Sachverhalt nicht aufklären. Ohne Färbung blieben die Photorezeptorschicht (weder innere noch äußere

ERGEBNISSE

Segmente) sowie die innere plexiforme Schicht. Betrachtet man das Vorkommen von Cytochrom c in der Retina von *Spalax* (Abbildung 3-22) als Marker für das Vorkommen von Mitochondrien, so zeigt sich, dass alle Schichten Cytochrom c exprimierten. Die stärkste Expression war zu sehen in der PS und GZS, gefolgt von beiden plexiformen Schichten. Die schwächste Färbung zeigten die beiden nukleären Schichten, wenngleich sie doch eindeutig vorhanden war. Eine Kolokalisation zwischen Ngb und Cytochrom c war im *Spalax*-Auge nur teilweise gegeben und zwar in der GZS, der INS, der ÄNS sowie evtl. der ÄPS. Eindeutig keine Kolokalisation fand man in der Photorezeptorschicht. Die Veröffentlichung von Bentmann et al. (2005) zeigte in der Retina von Maus und Ratte jedoch eindeutig Kolokalisation zwischen Ngb und Cytochrom c in der PS, ÄPS, IPS und GZS.

ERGEBNISSE

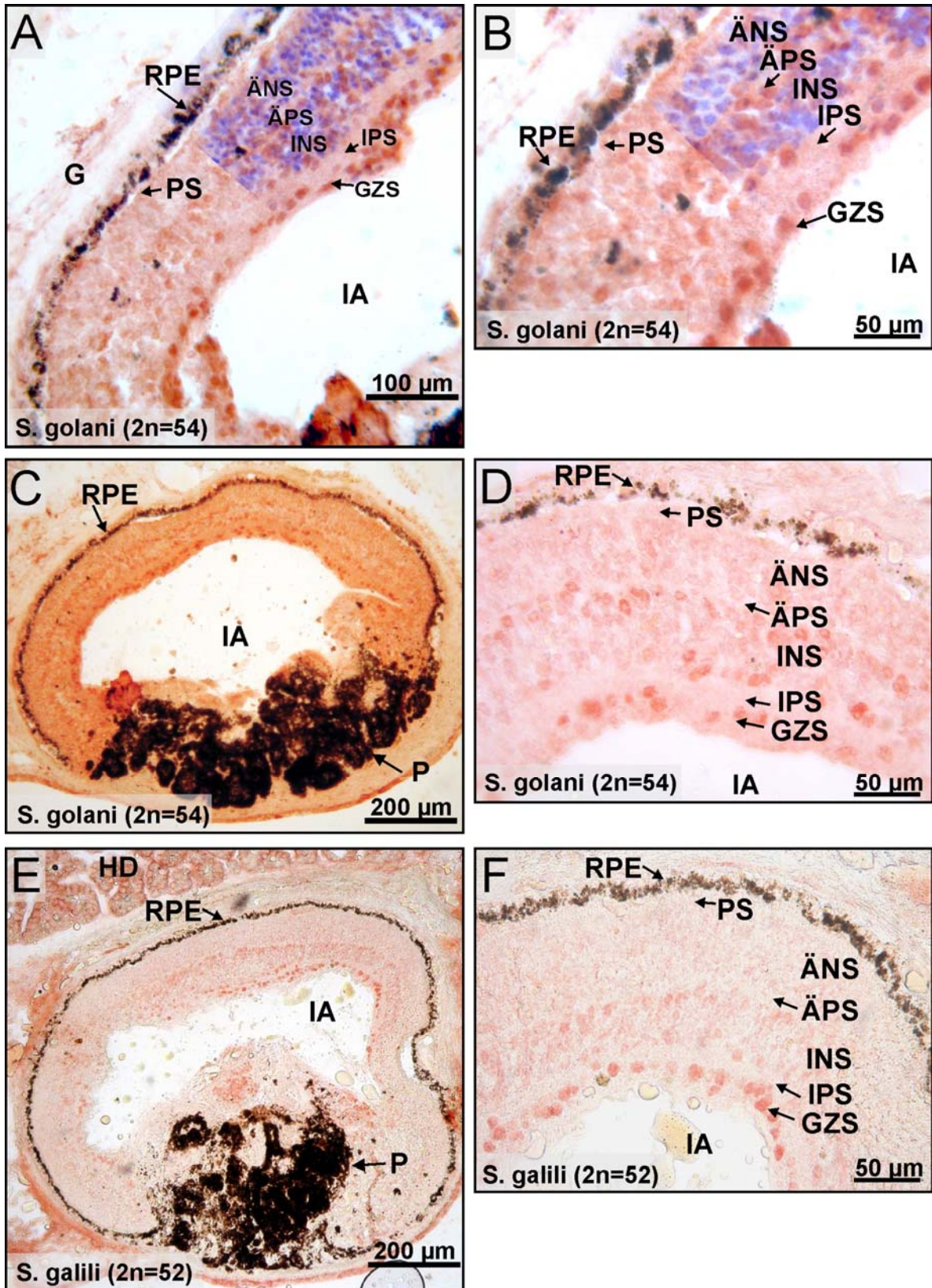


Abbildung 3-21: (A-G) Neuroglobin Protein-Expression im Auge von *Spalax*. Die Hauptexpressionsorte von Ngb sind die Ganglienzellen der Ganglienzellschicht (GZS) und einige Zellen der inneren nukleären Schicht (INS). Andere Bereiche, wie die äußere nukleäre Schicht (ÄNS), zeigten ebenfalls Ngb-Expression. Die Photorezeptorschicht sowie die plexiformen Schichten zeigten keine oder nur schwache Ngb-positive Zellen. Eine starke Färbung ist in den Zellen der Harderschen Drüse (HD) zu erkennen, die Gefäße G sind nur leicht gefärbt.

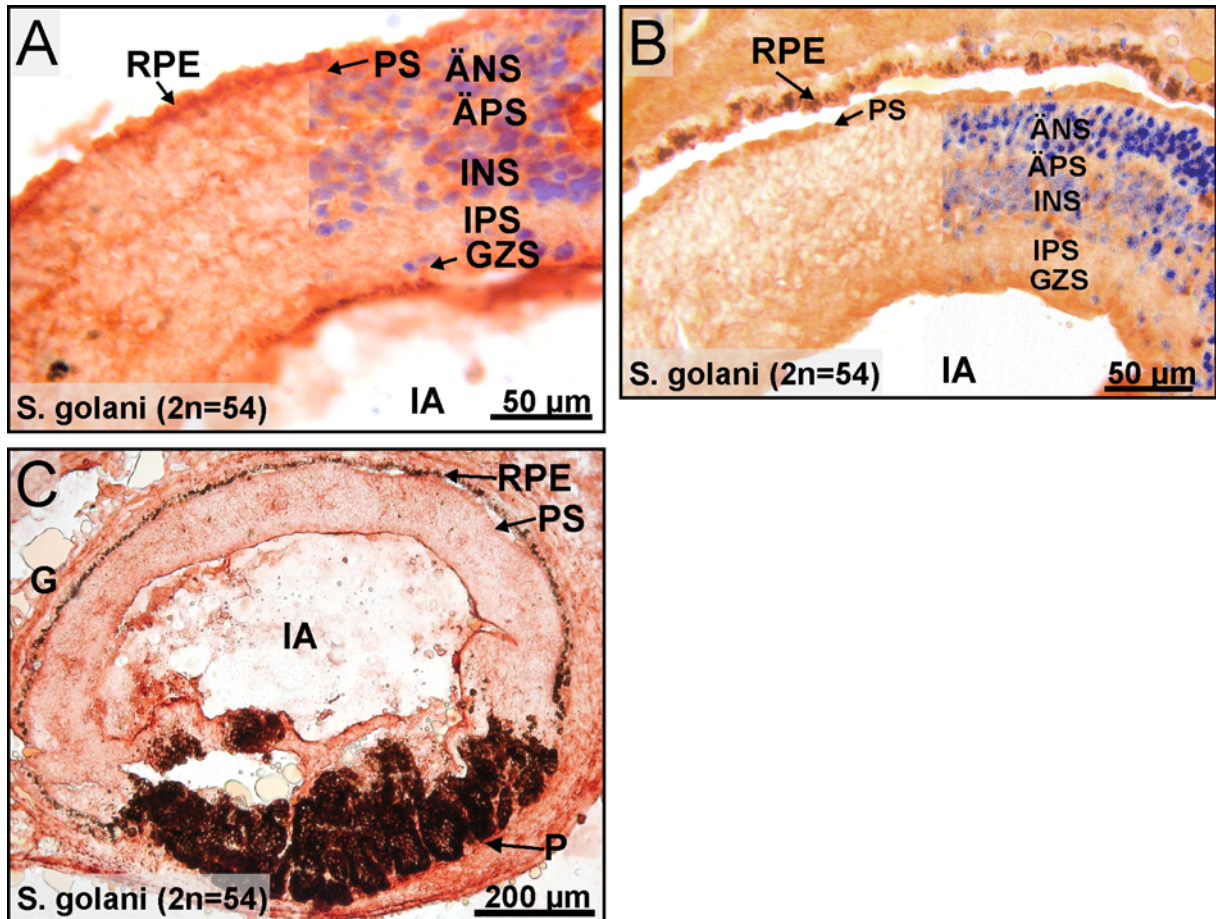


Abbildung 3-22: (A-C) Expression von Cytochrom c in der Retina von *S. golani* ($2n=52$). Die stärkste Färbung war in der Photorezeptorschicht sowie der Ganglienzellschicht zu erkennen. Alle anderen retinalen Schichten zeigten ebenfalls eine Cytochrom c-positive Färbung. Auch die außerhalb der Pigmentschicht liegenden Gefäße zeigten Cytochrom c-Färbung.

3.1.4.2 *Quantitative Expressionsuntersuchung der Ngβ-mRNA im Auge im Interspeziesvergleich und unter hypoxischen Bedingungen*

Es wurde die Expression zwischen dem Rattenauge und dem sehr stark degenerierten Spalaxauge untersucht. Zur Präparation der RNA wurden mindestens vier Augen jeweils von unterschiedlichen Individuen verwendet, die vor der RNA-Präparation gepoolt wurden. Aufgrund der winzigen Augen von *Spalax* konnte die Retina nicht vom Rest des Auges getrennt werden, weshalb die gesamten Augen verwendet wurden. Bei den Versuchen mit der Ratte wurden Retinae verwendet, die von Linse, Glaskörper und Lederhaut befreit wurden. Es wurden zwei verschiedene Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Der erste hypoxische Zustand, der nur in der Ratte untersucht wurde, betrug 3 % O_2 für 2,5 h. Die Ngβ-Expression in Ratte und *Spalax* wurde außerdem bei 10 % Sauerstoff für 4, 12, 22 und 44 h gemessen (Abbildung 3-23). Der normoxische Vergleich von Ratte und *Spalax* zeigte eine etwa 2-fach

ERGEBNISSE

höhere Expression von *Ngb* in Ratte. Die Expression von *Ngb* in *Spalax* könnte jedoch aufgrund der unterschiedlichen Präparationsmethoden zwischen *Spalax* und Ratte leicht unterschätzt worden sein, weil in *Spalax* das komplette Auge und nicht nur die isolierte Retina für RNA-Präparationen verwendet wurde. Dies könnte zu „Verdünnungseffekten“ im *Spalax*auge geführt haben. Betrachtet man die Hypoxieversuche, so regulierten beide Spezies unter allen untersuchten Zuständen das *Ngb*-Gen leicht hoch. Jedoch war weder in der Ratte noch in *Spalax* eine verstärkte Expression über den Faktor 2 hinaus zu beobachten.

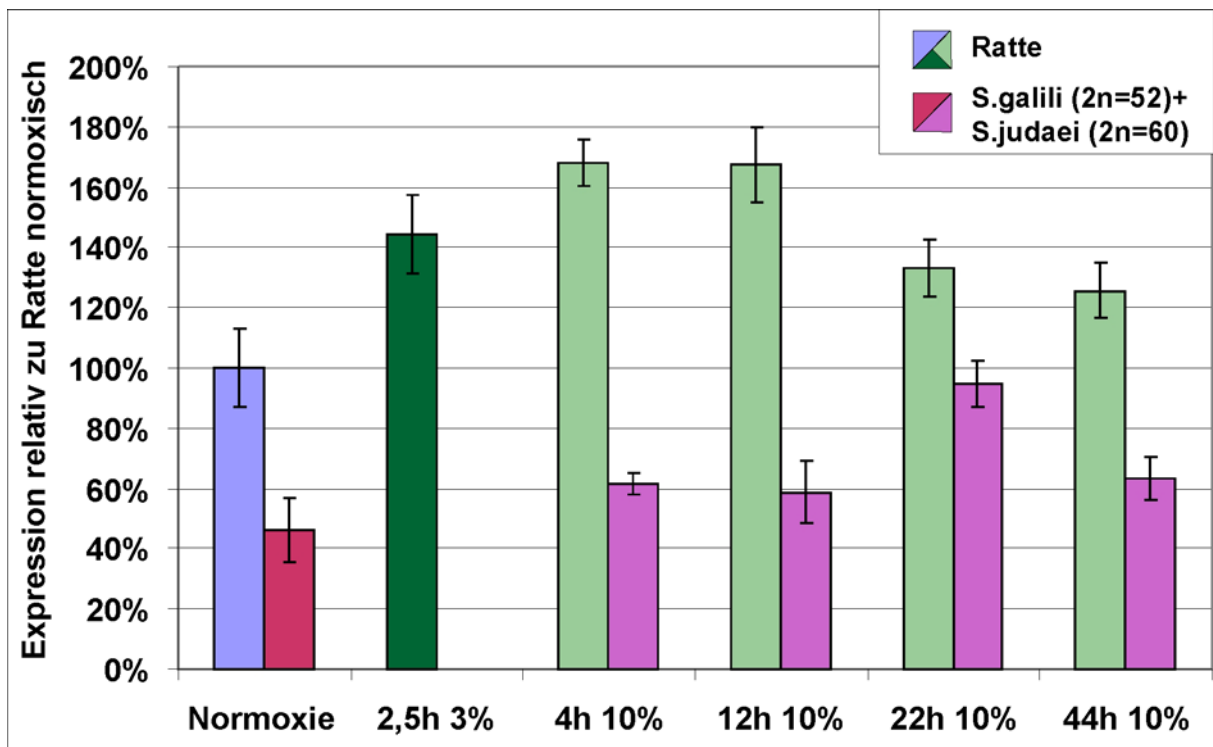


Abbildung 3-23: Expression des *Ngb*-Gens unter Hypoxie in Ratte und *Spalax*. Aufgrund der geringen Größe der *Spalax* Augen und der geringen Verfügbarkeit von Tieren aus einer Spezies wurden *S. galili* (2n=52) und *S. judaei* (2n=60) Augen zum Herstellen der RNA gepoolt. Die Rattenaugen zeigten unter Normoxie und Hypoxie stets eine höhere mRNA-Expression als die *Spalax*augen.

3.1.4.3 *Ngb* Proteinexpression im Auge von *Spalax*

Es wurde mittels Western Blot versucht, einen Western Blot mit *Spalax* Gesamtauge inklusive der Retina durchzuführen. Die zur Verfügung stehende Menge an *Spalax* Augen Protein-Extrakt genügte jedoch nicht, um ein Signal auf dem Western Blot zu erzeugen.

3.1.4.4 Vaskularisierung des *Spalax*-Auges

Die Vaskularisierung des Auges sollte mit Hilfe eines Antikörpers gegen den von-Willebrand-Faktor aufgeklärt werden. Maus und Ratte besitzen eine vaskuläre Retina, das Meerschweinchen hingegen eine avaskuläre. Vaskulär bedeutet, dass die Retina zusätzlich zu den Gefäßen der Choroidea (Aderhaut) in einigen ihrer Schichten selbst Kapillaren besitzt. Avaskulär heißt, dass keine Gefäße durch die Retina selbst führen, sondern dass die Sauerstoffversorgung lediglich durch Blutgefäße in der Choroidea (Aderhaut) gewährleistet wird. Aufgrund von Immunnachweisen des von-Willebrand-Faktors konnte nachgewiesen werden, dass *Spalax*, wie Maus und Ratte, eine vaskuläre Retina besitzt. Dabei sind eindeutig (Kapillar-) Gefäße in der äußeren plexiformen Schicht zu erkennen (Abbildung 3-24 A). Auch die Gefäße der Choroidea zeigten Immunreaktion (Abbildung 3-24 B).

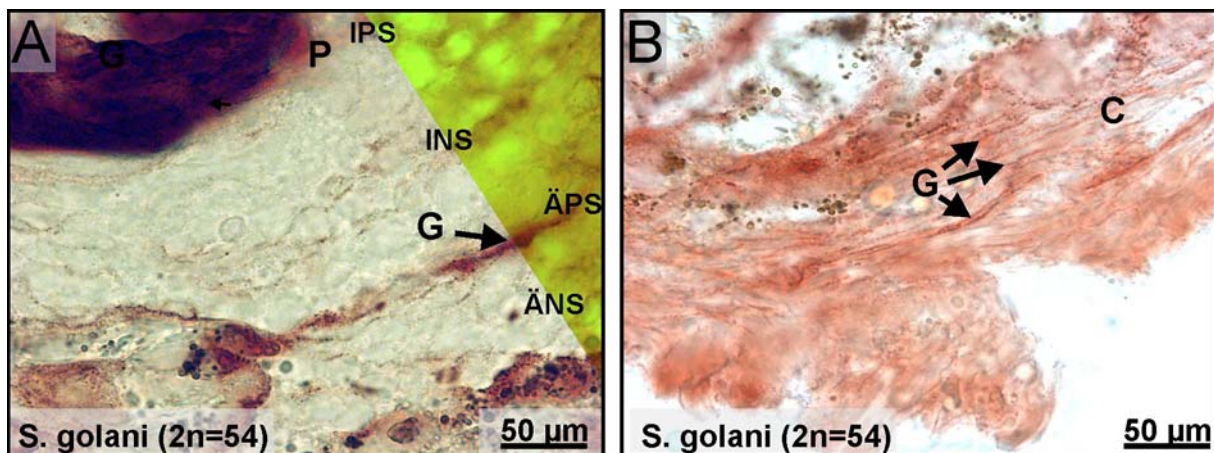


Abbildung 3-24: Darstellung der Vaskularisierung der *Spalax* Retina mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises des von-Willebrand-Faktors in den Endothelzellen der Gefäße. (A) Eine starke Färbung der Gefäße G ist zu erkennen in der äußeren plexiformen Schicht, was das Erkennungsmerkmal für eine vaskuläre Retina ist, wie sie auch bei Maus und Ratte vorkommt (Bentmann et al. 2005). (B) Auch die Gefäße der Choroidea C (Aderhaut) zeigen starke Färbung.

3.1.4.5 Lokalisation von *Cygb* und neuronaler NO-Synthase in der Retina von *Spalax*

Cytoglobin-Expression fand in der Retina fast ausschließlich in der Ganglienzellschicht statt (Abbildung 3-25). V. a. das Zytoplasma der neuronalen Zellen war gefärbt. Auch die innere plexiforme Schicht zeigte eine schwache Färbung durch die verwendete Methode des antikörpergekoppelten Peroxidasenachweises. Dabei befand sich das Protein, ähnlich wie im Gehirn, sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. Die neuronale NO-Synthase hingegen zeigte Färbung fast aller Schichten, vorzugsweise der Ganglienzellschicht, inneren plexiformen Schicht und der Photorezeptorschicht (Abbildung 3-26). Dabei gab es keine

E R G E B N I S S E

Immunreaktion in den Nuklei der Zellen. Ein Vergleich der Expression von *Cygb* mit neuronaler NO-Synthase ergab also eine schwache Übereinstimmung der Lokalisation der beiden Proteine. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die im Gehirn der Maus erhalten wurden. Dort hat man eine überwiegende Kolo-kalisation der beiden Proteine erhalten (Wystub 2007).

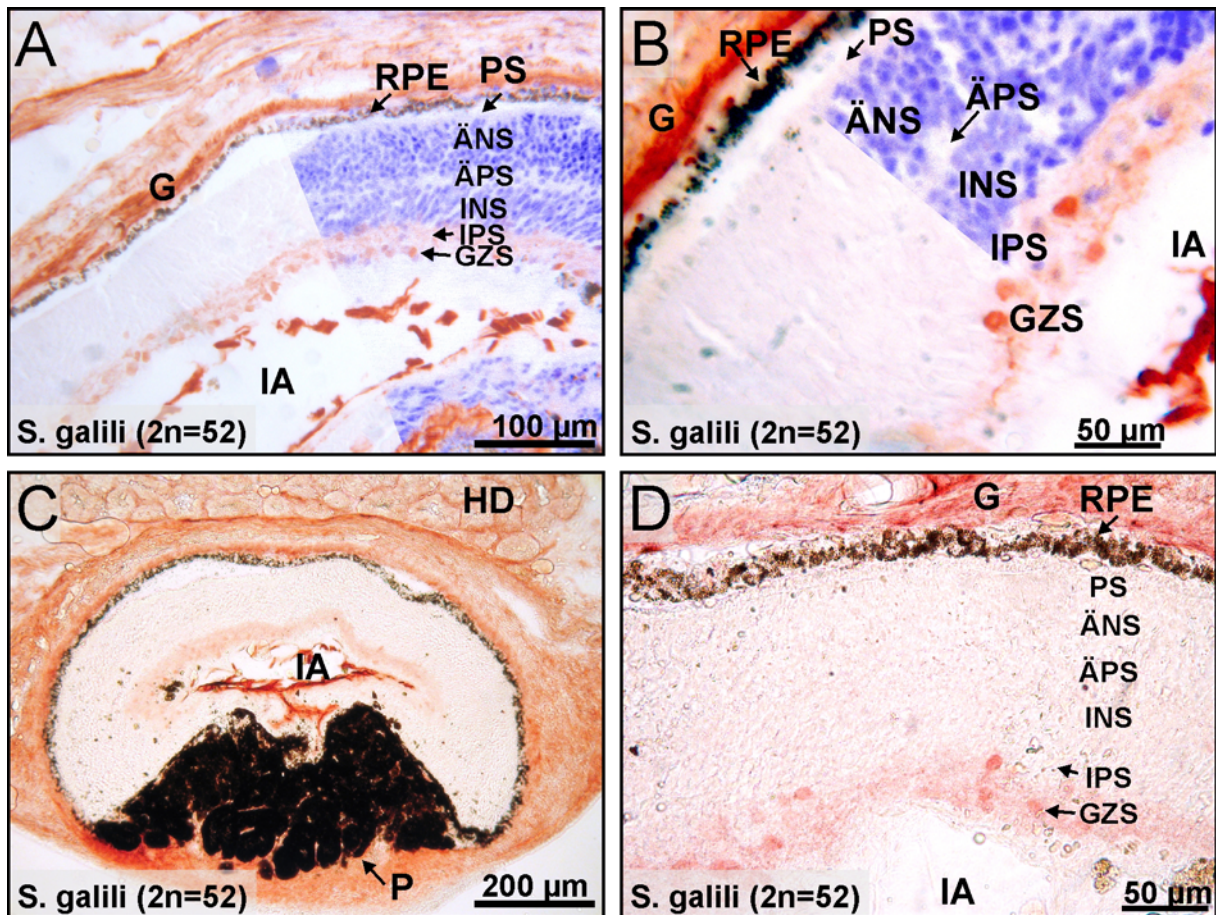


Abbildung 3-25: (A-D) Expression von *Cygb* im Auge von *Spalax*. Das Protein wurde in der inneren plexiformen Schicht (IPS) sowie den neuronalen Zellkörpern der Ganglienzellschicht (GZS) detektiert, erkennbar durch eine Rotfärbung. Eine starke Färbung war ebenfalls in den Gefäßen (G) außerhalb des retinalen Pigmentepithels zu finden, ebenso wie eine leichte Färbung der Harderschen Drüse, in die das Auge eingebettet ist. Die anderen Schichten zeigten keine *Cygb*-positive Färbung. Blau dargestellt sind Zellkerne der äußeren und inneren nukleären Schicht (ÄPS und IPS) sowie der GZS, die mit DAPI sichtbar gemacht wurden.

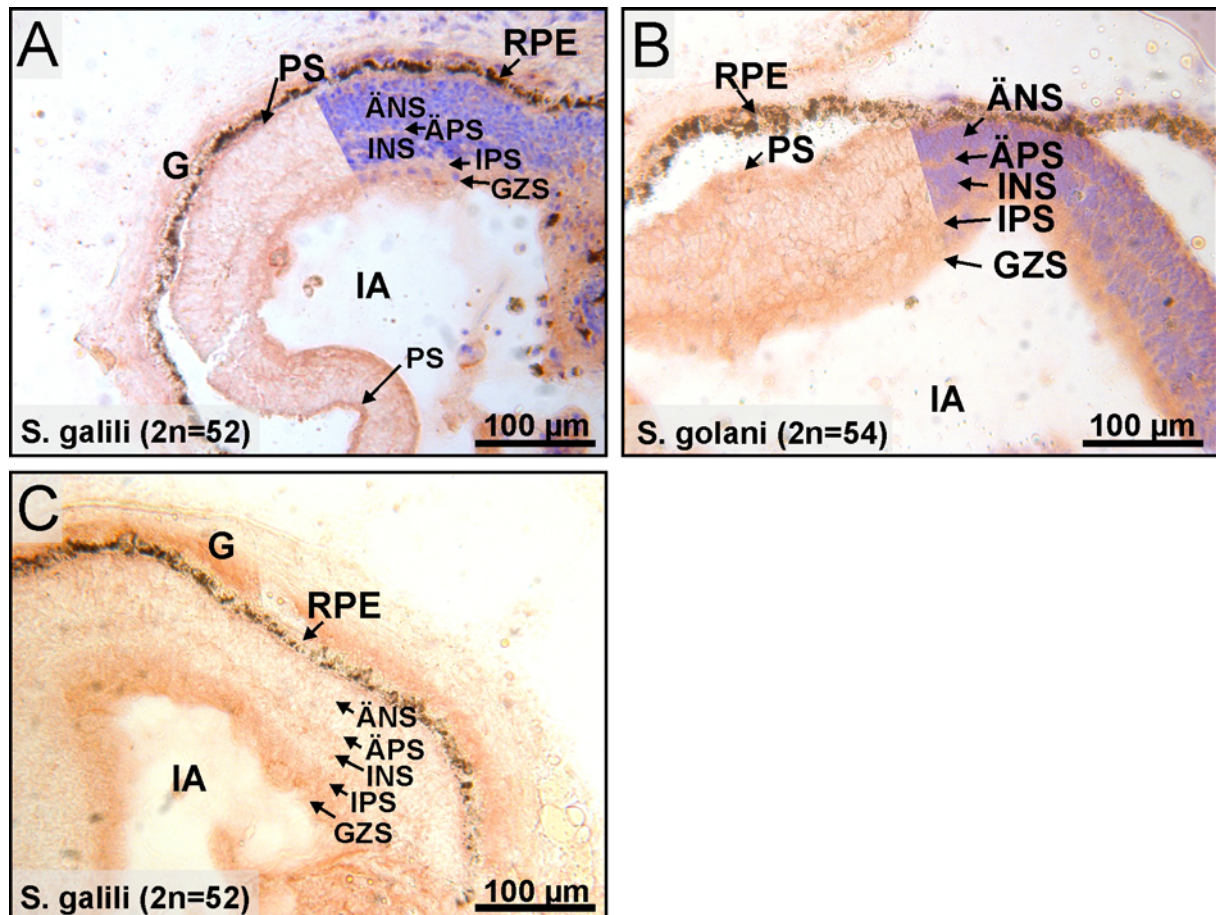


Abbildung 3-26: (A-C) Expression der neuronalen NO-Synthase (nNOS) im Auge von *Spalax*. Expression schien in allen Schichten der Retina vorhanden zu sein, mit der stärksten Färbung in der Photorezeptorschicht (PS) und der Ganglienzellschicht sowie der inneren plexiformen Schicht (GZS und IPS). In der Ganglienzellschicht waren nicht nur die Ganglienzellen selbst gefärbt, sondern auch das umgebende Gewebe. Die Gefäße (G) außerhalb des retinalen Pigmentepithels (RPE) zeigten ebenfalls eine starke Färbung. Die Kerne der Zellen wurden mit DAPI angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (dargestellt in blau).

3.1.4.6 Quantitative Untersuchung der *Cygb*-mRNA in Auge von Ratte und *Spalax* unter Hypoxie

Die Expressionsuntersuchung von Cytoglobin im Auge von Ratte und *Spalax* zeigte, dass es in *Spalax* eine um den Faktor 1,6 höhere Expression von *Cygb* gab (Abbildung 3-27), wobei man die relativ hohe Standardabweichung in der Ratte berücksichtigen muss. Die *Spalax*-Proben wurden aus den unter 3.1.1.3.2 angesprochenen Gründen gepoolt. Auch im Fall von *Cygb* könnte es zu einer Unterschätzung der Expression in *Spalax* gekommen sein, da es sich bei den untersuchten Proben um ganze Augen, nicht um isolierte Retinae wie bei der Ratte handelte (vgl. 3.1.4.2).

ERGEBNISSE

Nach einer Hypoxie von 3 % Sauerstoff für 2,5 h erfolgte eine Herunterregulation auf ca. 30 % der Ausgangsexpression in der Ratte. Dieser Hypoxiezustand wurde in *Spalax* aufgrund mangelnder Gewebeverfügbarkeit nicht getestet. Eine 10 %ige Hypoxie hingegen führte nach allen getesteten Zeiten in Ratte und *Spalax* zu einer merklichen Hochregulation. Nach 4 h stieg die Regulation auf den dreifachen Ausgangswert an. Nach 12 bzw. 24 h lag die Expression sogar noch etwas darüber. 44 h nach Versuchsbeginn sank bei 10 % O₂ die *Cygb*-Expression wieder auf das zweifache des Ausgangswertes, wobei eine hohe Standardabweichung zu beobachten war. In *Spalax* stieg die Expression nach 4 h bei 10 % Sauerstoff zuerst nur leicht an, etwa um einen Faktor von 1,3. Nach 12 h lag die *Cygb* Expressionsstärke bei etwa 260 % des Ausgangswertes. Die Hochregulation war somit in *Spalax* geringer als in der Ratte, erreichte aber in *Spalax* absolut einen etwas höheren Wert. Nach 22 h bei 10 % sank die Expression auf knapp das zweifache des Normoxiewertes an, nach 44 h war dieser fast wieder erreicht.

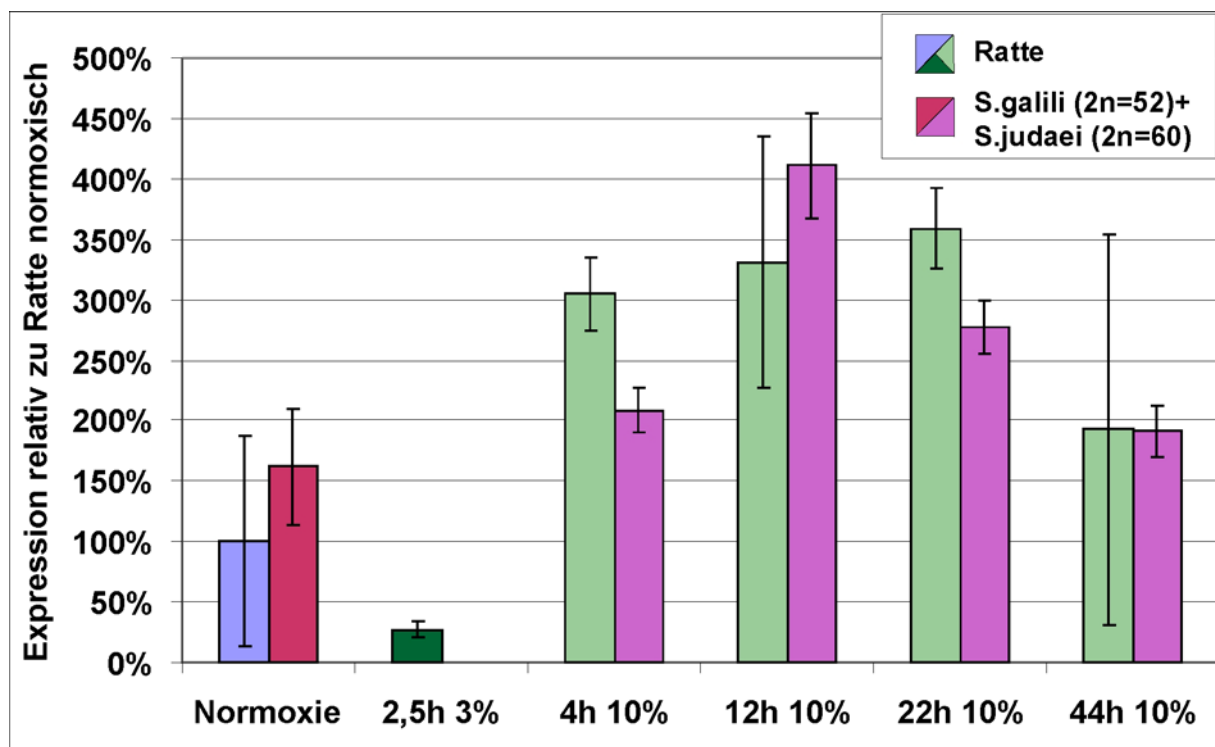


Abbildung 3-27: Expression des *Cygb*-Gens im Auge von Ratte und *Spalax* im zwischenartlichen Vergleich sowie unter verschiedenen Sauerstoffmangelbedingungen. Die Augen von *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) wurden vor der RNA-Präparation gepoolt, um ausreichend RNA herstellen zu können.

3.2 Ngb und Cygb Expression im hypoxiesensitiven Modellorganismus Hausschwein (Sus scrofa)

3.2.1 Ngb und Cygb mRNA-Regulation nach tief hypothermem Kreislaufstillstand und Reperfusion

Die Expression von Ngb und Cygb im Gehirn von Versuchstieren wurde nach tief hypothermem Kreislaufstillstand junger Schweine untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass bei allen Gewebeprobe aus dem frontalen Cortex des Gehirns korrespondierende Regionen verwendet wurden. Es wurden Realtime RT-PCR-Versuche mit Schweinen durchgeführt, deren Kreislaufstillstand 60 oder 120 min betrug. Zusätzlich wurde analysiert, ob die Expression der untersuchten Gene durch die Gabe von immunsuppressiven Medikamenten beeinflusst werden konnte. Die Gabe dieser Medikamente erfolgte, weil diese häufig dazu eingesetzt werden, protektive Effekte im Gehirn operierter Kinder zu erzielen und zum Schutz vor systemischer inflammatorischer Antwort, obgleich es über die Wirksamkeit der eingesetzten Medikamente geteilte Ansichten gibt (Schubert et al. 2005). Alle untersuchten Gehirnproben wurden erst nach Entwöhnung von der EKZ und einer sechs-stündigen Reperusionsphase entnommen. Die Expressionswerte von Ngb und Cygb wurden auf das Referenzgen *Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0* (RPLP0) bezogen. Dazu wurde jeweils die relative Genexpression mit der $\Delta\Delta C_t$ Methode sowie der Standardkurvenmethode berechnet (vgl. 2.5.2.1), um die unterschiedlich starken Standardfehler, die bei beiden Methoden auftraten, zu dokumentieren. Die mRNA-Expression der Kontrolltiere wurde gleich 100 % gesetzt.

3.2.1.1 Neuroglobin-Regulation nach tief hypothermem Kreislaufstillstand

Nach 60-minütigem DHCA, gefolgt von 6-stündiger Reperusionsphase, war keine deutliche Veränderung der Expression von Ngb im Gehirn zu erkennen. 2-stündige, tiefe Hypothermie führte hingegen zu einer Herunterregulation auf 50 % (Abbildung 3-28). Diese Expression wurde auch durch eine Vorbehandlung der Tiere mit Methylprednisolon (24 und wenige Stunden vor der Operation) nicht verändert, weder durch systemische Gabe noch durch intrathekale Injektion in den Duralsack. Beim Vergleich der Ngb-Expression nach intramuskulärer Injektion von FK506 (ebenfalls DHCA 120) mit der Expression nach 120 min DHCA ohne Behandlung, zeigte Ngb eine um Faktor 2,4 erhöhte Expression nach Applikation des Immunsuppressivums. Der erreichte Ngb Level entsprach dem der Kontrollen

E R G E B N I S S E

bzw. dem nach 60-minütigem Kreislaufstillstand. Bei einem Tier gab es Komplikationen beim Verlegen des Bypasses, sodass es zusätzlich zu einer normothermen Hypoxie gekommen ist. Die Expression sank dabei leicht im Vergleich zu den anderen DHCA 60 Tieren auf einen Level von ca. 75 %.

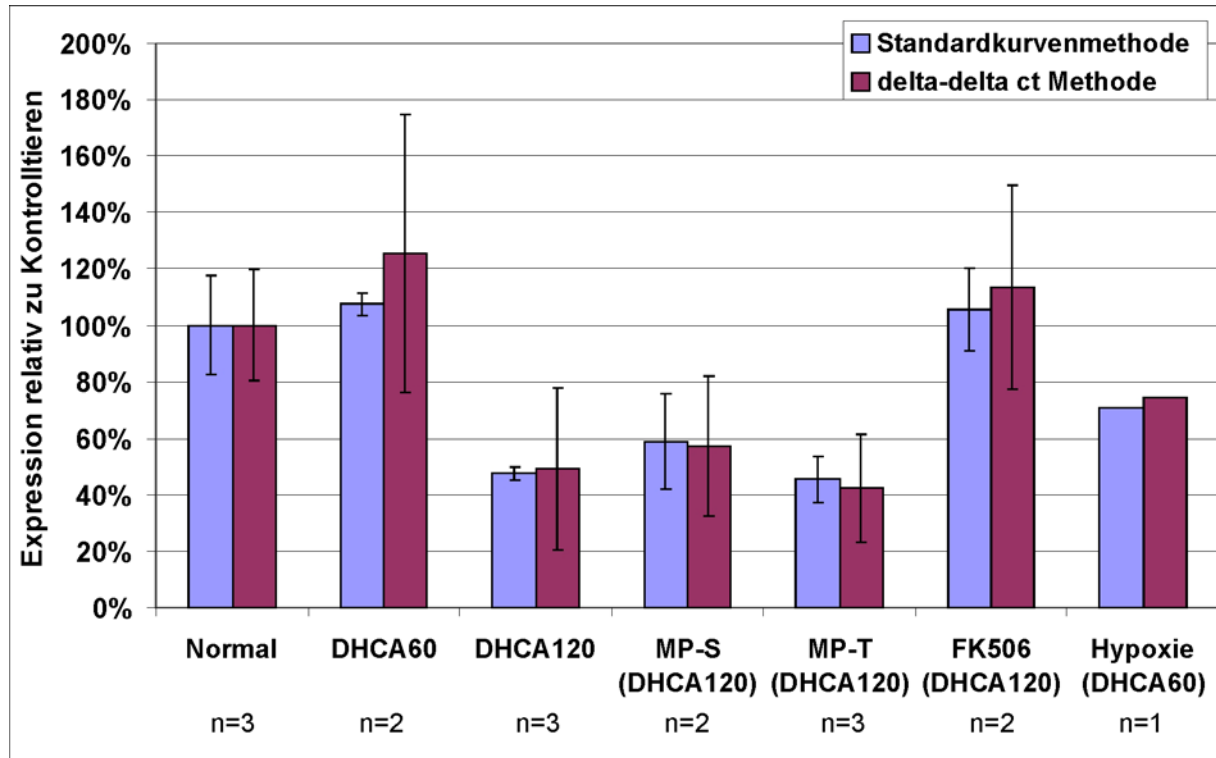


Abbildung 3-28: Expression des Ngb-Gens nach verschiedenen Zeiten des Kreislaufstillstandes bzw. zusätzlicher Medikamentenvorbehandlung. Die hier gezeigten Gehirnproben waren unbehandelt („normal“) oder einem Kreislaufstillstand von 60 bzw. 120 min ausgesetzt („DHCA 60“ oder „DHCA 120“). Die Proben wurden teilweise mit Methylprednisolon systemisch („MP-S“) oder thekal („MP-T“) behandelt. Einer Gruppe von Tieren wurde das Immunsuppressivum FK-506 intrathekal verabreicht („FK506“). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Die Expression von Neuroglobin wurde mittels Standardkurvenmethode bzw. $\Delta\Delta$ ct-Methode auf das RPLP0-Gen bezogen. Die Entnahme der Proben erfolgte nach sechsständiger Reperfusion. Hypoxie bedeutet, dass beim Anschließen der EKZ ein Problem auftrat und dass im Tier somit für längere Zeit keine Blutzirkulation herrschte.

3.2.1.2 Cytoglobin-Regulation nach tief hypothermem Kreislaufstillstand

Die Cygb-mRNA im Gehirn wurde nach 60-minütigem Kreislaufstillstand (DHCA 60) und anschließender 6-stündiger Reperfusionphase im Vergleich zu den Kontrolltieren 2,5 bis 3-fach hochreguliert (Abbildung 3-29). Nach 2-stündigem DHCA (DHCA 120) gab es eine leicht erhöhte Expression um ca. 30 %. Eine systemische Vorbehandlung mit Methylprednisolon führte zu einer verstärkten Cygb-Expression um den Faktor 3,1 bis 3,6.

E R G E B N I S S E

Thekale Injektion ergab eine im Vergleich zu DHCA 120 um ca. 40 % verringerte Expression. Das Immunsuppressivum FK506, verbunden mit 2-stündigem Kreislaufstillstand, führte zu einer zweifach verstärkten Expression von Cygb im Gehirn beim Vergleich mit den Schweinen, die einem 2-stündigen Kreislaufstillstand ohne Behandlung ausgesetzt waren. In der Gehirnprobe, die durch Probleme beim Anschließen der EKZ (DHCA 60) zusätzlich normothermer Hypoxie ausgesetzt war, gab es in etwa eine gleich hohe Expression wie in den Kontrolltieren, also eine niedrigere Expression verglichen mit den DHCA 60 Proben.

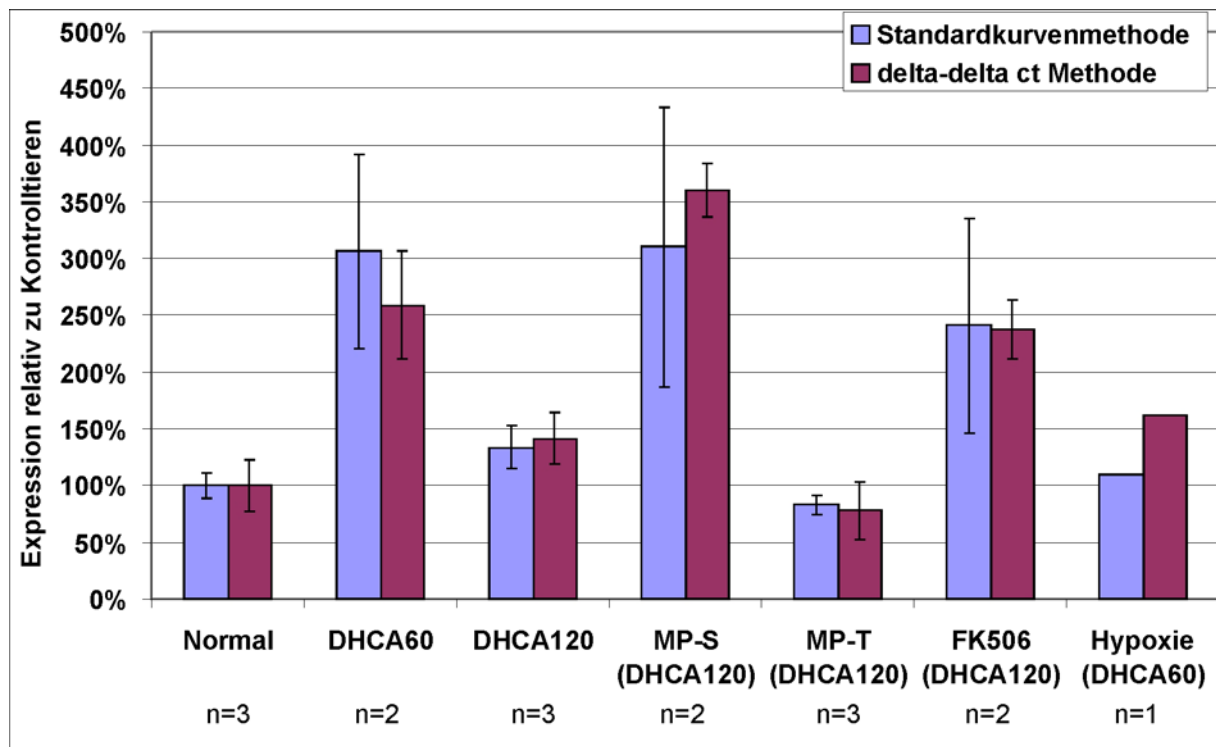


Abbildung 3-29: Expression des Cygb-Gens nach verschiedenen Zeiten des Kreislaufstillstandes bzw. Medikamentenvorbehandlung. Die hier gezeigten Gehirnproben waren unbehandelt („normal“) oder einem Kreislaufstillstand von 60 oder 120 min ausgesetzt („DHCA60“ oder „DHCA120“). Die Proben wurden teilweise mit Methylprednisolon systemisch („MP-S“) oder thekal („MP-T“) behandelt. Einer weiteren Gruppe von Tieren wurde das Immunsuppressivum FK-506 intrathekal („FK506“) verabreicht. Die Expression von Neuroglobin wurde mittels Standardkurvenmethode bzw. $\Delta\Delta$ ct-Methode auf das RPLP0-Gen bezogen. Die Entnahme der Proben erfolgte nach 6-stündiger Reperfusion. Hypoxie bedeutet, dass beim Anschließen der EKZ ein Problem auftrat und dass im Tier somit für längere Zeit keine Blutzirkulation herrschte.

3.3 Entwicklung einer Methode zur Normalisierung von quantitativen Realtime RT-PCR-Daten auf Ebene der cDNA mittels PicoGreen Fluorometermessung

Zur Normalisierung von relativen Expressionsverhältnissen nach qRT-PCR auf Ebene der cDNA wurden drei Messreihen durchgeführt. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Mengen an DNase-verdauter Gesamt-RNA aus Maus Cortex (500, 750, 900, 1000, 1100 und 1500 ng) für die reverse Transkription eingesetzt. Zusätzlich wurde eine *No-RT*-Kontrolle mit 1000 ng RNA angesetzt, jedoch ohne das Enzym reverse Transkriptase. Weiterhin wurde eine *No-template*-Kontrolle untersucht, ohne Zugabe von Gesamt-RNA, jedoch unter Zugabe von reverser Transkriptase. Zu jeder cDNA wurde die gleiche Menge des in ds-DNA- und DNA-RNA-Hybride interkalierenden Stoffes PicoGreen gegeben. An einzelsträngige oder zurückgefaltete RNA sollte PicoGreen nach Angaben des Herstellers nicht binden. Da es sich bei den von uns verwendeten Proben um DNase-verdaute RNAs handelte, sollte PicoGreen lediglich an DNA-RNA-Hybride binden. Läufe und Verdünnungen wurden dreifach angesetzt. Abbildung 3-30 zeigt die einzelnen Messwerte der cDNA-Verdünnungen sowie der *no-template*- und *no-RT*-Kontrollen. Trotz derselben Eichung des Gerätes bei wiederholten Läufen, erkennt man zwischen den einzelnen Wiederholungen relativ hohe Abweichungen. Wie man leicht sehen kann, wird bei einer Verdopplung der RNA-Menge nicht genau die doppelte Fluoreszenz gemessen, was man jedoch erwartet hätte.

ERGEBNISSE

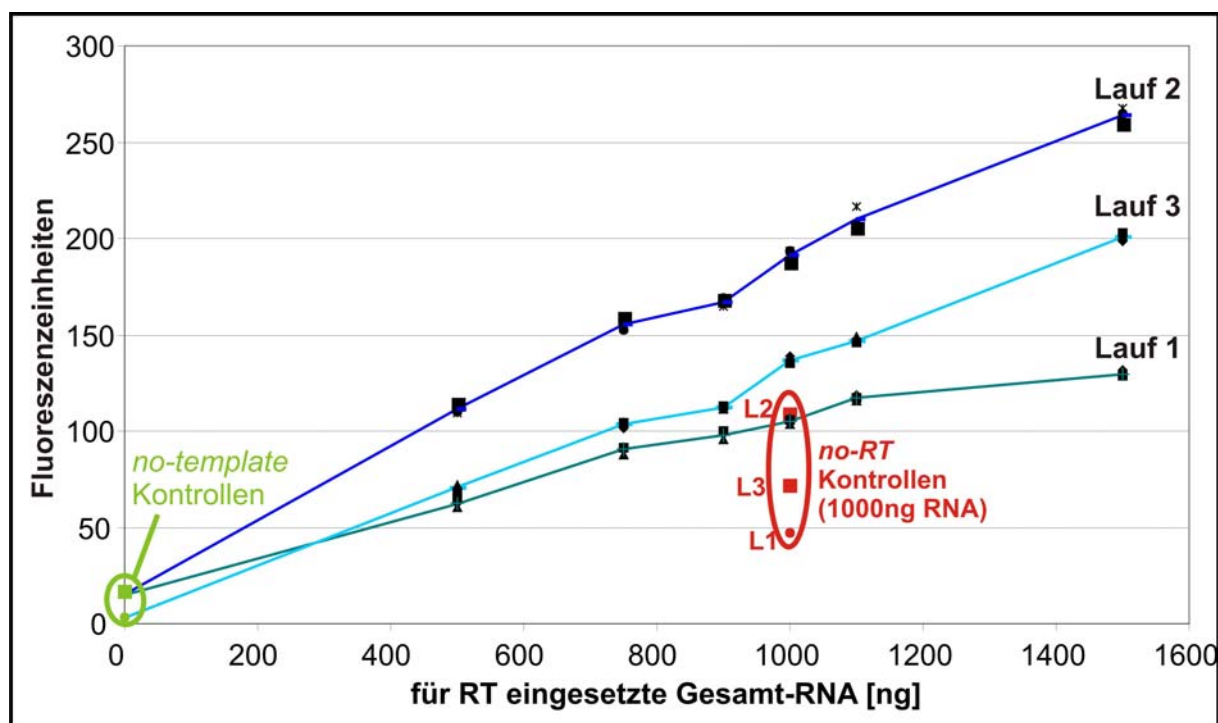


Abbildung 3-30: Mit dem Fluorometer TBS-380 (Turner-Biosystems) gemessene Fluoreszenzwerte der mit PicoGreen versetzten cDNAs. In drei wiederholten Messreihen wurden jeweils 500, 750, 900, 1000, 1100 und 1500 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Eine Verdopplung der eingesetzten Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese sollte zu einer Verdopplung der Fluoreszenz bei der Pico-Green Messung führen, was nicht bestätigt werden konnte. Zu jedem Lauf wurde eine *no-template*-Kontrolle ohne RNA im cDNA-Synthese-Ansatz sowie eine *no-RT*-Kontrolle mit 1000 ng RNA, jedoch ohne reverse Transkriptase angesetzt. Lauf 3 unterscheidet sich von den anderen beiden dadurch, dass die eingesetzte cDNA vor PicoGreen Messung mit Dialysepuffer gefällt wurde. Auffällig sind die großen Differenzen zwischen den einzelnen Läufen, obwohl das Fotometer vor jedem Lauf mit derselben DNA geeicht wurde. Die Linien der einzelnen Läufe verbinden die Mittelwerte der Einzelmessungen.

Tabelle 3-1 stellt die relativen Fluoreszenzen eines jeden Laufs dar, bezogen auf die 1000 ng-cDNA-Probe, die als Bezugspunkt (= 100 %) verwendet wurde. Ein Unterschied von Lauf drei zu den anderen Läufen war, dass die eingesetzten cDNAs vor Messung im Fluorometer gefällt wurden, um Daten zu erhalten, die besser linear verlaufen. Wie an den einzelnen Werten zu erkennen ist, lag die gemittelte relative Fluoreszenz im Bereich des Sollwertes, abgesehen von der 1500 ng-Probe, deren durchschnittliche Fluoreszenz etwas unter dem erwarteten Wert lag. Auch die *no-RT*-Kontrolle, die 1000 ng Gesamt-RNA enthielt (jedoch keine reverse Transkriptase), zeigte mit $52,2\% \pm 7,7\%$ eine sehr hohe relative Fluoreszenz, was in etwa der Hälfte der Fluoreszenz des 1000 ng-Ansatzes entsprach, in welchem reverse Transkriptase vorhanden war.

E R G E B N I S S E

Tabelle 3-1: Zusammenfassung der auf 1000 ng normalisierten Fluoreszenzwerte der cDNAs aus drei unabhängigen Messungen.

cDNA-Probe	Sollwert	Messung 1 relative Fluoreszenzwerte	Messung 2 relative Fluoreszenzwerte	Messung 3 relative Fluoreszenzwerte	Messung 1-3 gemittelte relative Fluoreszenzwerte	gemittelte Realtime RT-PCR-Werte
500 ng	50 %	59,3 % ± 2,1 %	58,1 % ± 1,4 %	51,4 % ± 1,3 %	56,3 % ± 4,3 %	63,2 %
750 ng	75 %	85,7 % ± 2 %	81,1 % ± 1,7 %	75,7 % ± 1,3 %	80,8 % ± 5 %	100,5 %
900 ng	90 %	93,1 % ± 2,1 %	87,3 % ± 1,3 %	82,3 % ± 0,6 %	87,5 % ± 5,4 %	123,9 %
1000 ng	100 %	100 % ± 1,3 %	100 % ± 1,7 %	100 % ± 1,3 %	100 % ± 0 %	100 %
1100 ng	110 %	111,3 % ± 1,3 %	109,6 % ± 3,1 %	107,7 % ± 1,1 %	109,5 % ± 1,8 %	131,7 %
1500 ng	150 %	123,3 % ± 1,5 %	137,8 % ± 2 %	147,7 % ± 1,6 %	136 % ± 12 %	184,5 %
<i>no-RT-Kontrolle</i> (1000 ng)	0 %	44,6 % ± 0,6 %	60 % ± 2,6 %	52,1 % ± 0,7 %	52,2 % ± 7,7 %	nicht detektiert
<i>no-template-Kontrolle</i>	0 %	11,8 % ± 1,1 %	8,3 % ± 0,8 %	0,3 % ± 0,1 %	6,8 % ± 5,9 %	nicht detektiert

Die Proben wurden anschließend zum einen noch in der qRT-PCR daraufhin untersucht, ob eine Verdopplung der für die cDNA-Synthese eingesetzte Gesamt-RNA-Menge auch zu einer Verdopplung der entstehenden PCR-Produkte führte. Zum anderen sollte herausgefunden werden, ob sich die relativen Unterschiede der mit Pico-Green quantifizierten cDNA Proben zueinander ebenso verhalten, wie dieselben Proben nach Auswertung mit qRT-PCR. Dazu wurde der 100 %ig effizient arbeitende Neuroglobin-Assay mit Maus-Gewebe verwendet.

Die Expressionsuntersuchungen mittels qRT-PCR haben keinen linearen Verlauf ergeben. Vielmehr schwankten die relativen Expressionswerte bei eingesetzten Mengen von 750-1100 ng enorm, die Werte zwischen der 500 ng-, der 1000 ng- und der 1500 ng-Probe zeigten nicht allzu starke Schwankungen, jedoch auch keine Linearität.

4 Diskussion

Während aquatisch lebende Vertebraten, wie Fische und Schildkröten, in Umgebungen leben, die natürlicherweise Sauerstoffmangel ausgesetzt sind, kommen die meisten Säuger niemals oder nur äußerst selten mit hypoxischen Umweltbedingungen in Kontakt. Daher ist es äußerst unwahrscheinlich, dass die Gehirne und anderen Gewebe von „normalen“ terrestrischen Lebewesen gut an Hypoxie angepasst sind. Hypoxie tritt aber unter pathologischen Bedingungen bei Schlaganfall oder Herzinfarkt auf. Daher sind insbesondere hypoxietolerante Säuger wie *Spalax*, von potenzieller biomedizinischer Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit soll im Speziellen die Frage beantworten, ob die Globine Ngb und Cygb in die Hypoxieantwort von Säugetieren einbezogen sind, ob es also Anpassungen der Expression des Ngb-Gens bzw. des Proteins als Antwort auf Sauerstoffmangelzustände gibt. Weiterhin geht es in der Arbeit darum, ob es unterschiedliche Regulationsmechanismen für Tiere gibt, die zum einen nicht, zum anderen extrem an Hypoxie angepasst sind. Daher wurden verschiedenartig an Hypoxie angepasste *Spalax*-Arten mit der Wanderratte *Rattus norvegicus* verglichen. Ein weiterer Organismus, der natürlicherweise nicht an Hypoxie angepasst ist, ist das Hausschwein *Sus scrofa*. In der Arbeit wurde das Schwein als biomedizinisches Modell für die Operation am Säuglingsherzen untersucht, wo es nach Hypoxie ebenfalls zu Schädigungen kommen kann. Jedoch sind nicht nur Anpassungen an hypoxische Zustände auf Expressionsebene möglich, sondern es gibt auch auf anderen Ebenen adaptive Evolution (z. B. Sequenzen). In diesem Organismus wurde ebenfalls die Rolle von Ngb und Cytoglobin untersucht.

4.1 Neuroglobin in *Spalax*

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ebenen einer möglichen Adaptation von Ngb an das Leben im Untergrund untersucht. Im Folgenden werden die Aspekte einer Anpassung auf der Sequenzebene beleuchtet, im Anschluss daran werden die Besonderheiten der Expression von *Spalax* Neuroglobin besprochen.

4.1.1 Interspeziesvergleich von Neuroglobin: Kaum Hinweise auf Sequenzadaptation der verschiedenen *Spalax*-Spezies mit anderen Vertebraten

Die Aminosäure-Sequenz des *Spalax* Neuroglobins wurde bereits in meiner Diplomarbeit (Gerlach 2002) untersucht, damals jedoch nur in einer Spezies (*Spalax carmeli*). Im Zuge der vorliegenden Arbeit und in Kooperation mit Prof. Dr. Aaron Avivi (*Institute of Evolution, Haifa, Israel*) wurden die kodierenden Sequenzen der orthologen Gene aus den anderen israelischen *Spalax*-Spezies isoliert und deren Proteinsequenz abgeleitet. Die erhaltenen Sequenzen sind in Abbildung 4-2 vergleichend mit allen bisher bekannten orthologen Neuroglobinen dargestellt. Es gibt daher durchaus Aminosäurepositionen, die spezifisch in *Spalax* vorhanden sind. An Sequenzvergleich-Position 20 (Helix A) kommt in allen vier *Spalax*-Spezies die Aminosäure Threonin vor. Bei den meisten anderen untersuchten Spezies, außer in *Xenopus tropicalis*, befinden sich an dieser Position die zu Threonin nicht isofunktionellen Aminosäuren Alanin und Serin. An Alignment Position 24 (Helix B) ist in den *Spalax*-Spezies ein Asparagin zu finden, in den anderen Säugern die wahrscheinlich isofunktionelle Aminosäure Serin. Fische, die wie der Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) oder der Japanische Reisfisch (*Oryzias latipes*) zum Teil ebenfalls aufgrund ihres Vorkommens in zeitweise sauerstoffarmen Gewässern in einem extremen Ausmaß hypoxietolerant sind, besitzen an dieser Position, ebenso wie *Spalax*, ein Asparagin. Die Aminosäure Serin an Position 50 des Alignments (Bereich zwischen Helices C und D) ist ausschließlich in *Spalax golani* ($2n=54$) und der hypoxieresistentesten *Spalax*-Art *S. galili* ($2n=52$) sowie in den beiden ebenfalls hypoxieresistenten Karpfenfischen *Danio rerio* und *Pimephales promelas* (Goldelritze) zu finden. Die anderen bisher sequenzierten Vertebraten, inklusive der anderen Fischspezies, besitzen an dieser Position zu Serin isofunktionelle Aminosäuren wie Threonin oder Alanin. An Alignment Position 132 (Helix H) ist in das Neuroglobin von *Spalax judaei* ($2n=60$) anstelle des Prolins der orthologen Säugerproteine ein nicht isofunktionelles Leucin eingebaut. Diese Sequenzuntersuchungen zeigen, dass in der Sequenz der vier verschiedenen *Spalax*-Spezies wohl wenig adaptives Potenzial liegt.

Das Aminosäuresequenzalignment von Myoglobin (Anhang 1), das auch schon von Gurnett et al. (1984) untersucht wurde, zeigt, dass es in *S. carmeli* ($2n=58$) keine für *Spalax* einzigartige Aminosäure gibt. Es gibt lediglich einen nagetierspezifischen Aminosäureaustausch an Position 88 (F-Helix) des Sequenzvergleichs. An dieser Stelle kommt in Nagern Glutamin oder Alanin vor. In den anderen untersuchten Spezies (landlebende und tauchende Säuger

DISKUSSION

sowie Fische) ein Lysin. Die Frage, ob diese Position für eine Adaptation von Nagetieren an Sauerstoffmangel verantwortlich ist, ist eher zu verneinen, da Ratte und Maus nicht an Sauerstoffmangel adaptiert sind.

Betrachtet man die Aminosäuresequenz von Hämoglobin in *Spalax*, so gibt es in den beiden chromosomalen Spezies *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) beim Vergleich der α - und β -Ketten zwischen *Spalax*, Maus und anderen Nagern keine Anzeichen für eine Anpassung an das Leben unter Tage (Kleinschmidt et al. 1985).

Auch bei der Betrachtung der Gensequenz gibt es wenige Hinweise auf adaptives Potenzial. Das MIRb-Element aus Intron 3 wurde in allen untersuchten Spezies gefunden, jedoch nur die Ratte und die Maus haben in diesem MIRb Element eine synapomorphe 30 Bp Deletion (Abbildung 4-1), was die nähere Verwandtschaft von Ratte und Maus verglichen zu *Spalax* bestätigt (Reyes et al. 2004).

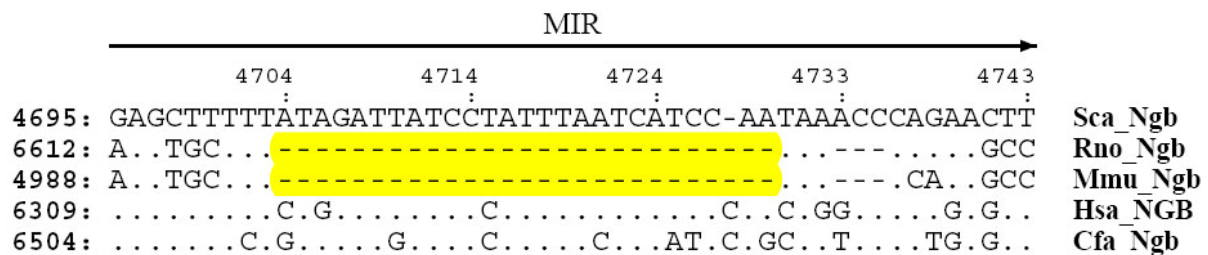


Abbildung 4-1: Synapomorphe 30 Bp-Deletion (gelbe Markierung) in Intron 3 des Neuroglobingens von Ratte und Maus, verglichen mit *S. carmeli* (2n=58), Mensch (Hsa) und Hund (Cfa).

Das in Intron 3 lokalisierte L2 Element, das ein Cluster verschiedener kürzerer Repeattypen beinhaltet, ist in allen Spezies vorhanden. Das spricht für eine stammesgeschichtlich lange Existenz dieser Repeats im Ngb-Gen. Das ebenfalls konserviert in Intron 3 vorliegende MLT1H2-Element gehört zur Gruppe der alten Retrovirus-artigen LTRs (*long terminal repeats*). Die Amplifikation von LTR und MaLR Elementen in Genomen begann schon vor der Radiation der eutherischen Säugetiere vor 80-100 Millionen Jahren (Smit 1996), was eine lange Existenz dieses Elements bestätigt.

4.1.2 Neuroglobin in *Spalax*: Adaptation durch Veränderung der Genexpression

Bei der vergleichenden Untersuchung der Neuroglobin-Expression der hypoxiesensitiven Ratte mit den beiden hypoxieresistenten Arten *S. judaei* (2n=60) und *S. galili* (2n=52) fällt die bei Normoxie um eine vielfach erhöhte Ngb-Konzentration auf (vgl. 3.1.1.3). Dies gilt für die mRNA- und Proteinebene. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine adaptive Eigenschaft der beiden *Spalax*-Arten gegenüber der Ratte. Die Eigenschaft, dass eine hypoxieresistente Art ein „Mehr“ an Ngb besitzt, konnte kürzlich auch in dem hypoxieresistenten Goldfisch (*Carassius auratus*), verglichen mit dem weniger gut an Hypoxie angepassten Zebrahäring (*Danio rerio*), gezeigt werden (Roesner et al. unveröffentlicht).

Betrachtet man sich nun die Expression von Neuroglobin unter Hypoxie, so erhält man ein unerwartetes Ergebnis. Wie in Abbildung 3-5 und Abbildung 3-7 gezeigt, verringert sich in der Ratte und den beiden *Spalax*-Spezies unter Hypoxie die Expression des Neuroglobins um 50 %. Die Ergebnisse der Hypoxieversuche (vgl. 3.1.1.3.1) mit der Ratte stimmen mit denen aus *S. judaei* (2n=60) überein. Beide Spezies regulieren Ngb gleichartig herunter, sei es nach kurzer, intensiver oder nach milder, länger andauernder Hypoxie. In *S. galili* (2n=52) hingegen reicht die kurze intensive Hypoxie (5 h, 6 % Sauerstoff) offenbar nicht aus, um eine Hypoxieantwort von Ngb zu induzieren. Nach 22 bzw. 44 h verhält sich *S. galili* (2n=52) jedoch wie die Ratte und *S. judaei* (2n=60). Dieses artspezifische Expressionsmuster in Ratte und *Spalax* legt die Vermutung nahe, dass es sich nicht lediglich um einen willkürlichen Energieeinsparmechanismus handelt, sondern, dass vom Organismus eine gezielte Verringerung des Ngbs angestrebt wird.

Eine Veränderung in der Ngb-Expression zeigt *Spalax* indessen nicht nur auf quantitativer Ebene, sondern auch qualitativ auf zellulärem Niveau. Die Neuroglobin-Signale in *Spalax* waren in ihrer regionalen Verbreitung sowie Intensität der Färbung zunächst grundlegend identisch zu den Ergebnissen, die bei Versuchen mit der Maus erhalten wurden (Reuss et al. 2002; Wystub et al. 2003; Hankeln et al. 2004). Bei der genaueren Untersuchung konnte jedoch nicht nur eine Expression von Ngb in Neuronen wie in der Ratte gefunden werden, sondern auch in Gliazellen (Abbildung 3-4). Nicht auszuschließen ist, dass die zusätzliche Expression in Gliazellen auch dazu beiträgt, dass das *Spalax*-Gehirn höhere konstitutive Ngb-Level hat als die Ratte.

Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen legen eine Funktion von Ngb im O₂-Metabolismus nahe, sei es als Protein, das Sauerstoff speichert oder als Protein, das ROS/RNS detoxifiziert. Auch wäre eine neuroprotektive Funktion von Ngb denkbar, wie es

DISKUSSION

eine Arbeitsgruppe *in vivo* und *in vitro* postuliert, wenngleich deren molekulare Ursache unverstanden ist (Sun et al. 2001; Sun et al. 2003).

4.1.3 Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen des *S. carmeli* (2n=58) Neuroglobingens: Erklärungsansätze für die verstärkte normoxische Expression

Die genomische Sequenz des Neuroglobingens aus *Spalax carmeli* (2n=58) wurde exemplarisch für alle *Spalax*-Spezies auf das Vorkommen Hypoxie-responsiver Elemente (HREs) hin untersucht. Diese HREs bestehen aus einer Bindestelle des Transkriptionsfaktors Hif-1 und zusätzlich aus einer in der Nähe von ca. 50 Bp vorkommenden Hilfssequenz. Sie kann entweder eine weitere Hif-1 Bindestelle selbst sein oder eine in Tabelle 4-1 beschriebene akzessorische Hilfssequenz. Dabei spielt es keine Rolle, in welcher Richtung die Bindestellen orientiert sind und wo diese im Gen liegen (Wystub et al. 2004).

Tabelle 4-1: Zusammenstellung ausgesuchter Transkriptionsfaktorbindestellen, deren Erkennungssequenzen sowie Referenzen (nach Wystub et al. 2004).

Bindestelle	Sequenzmotiv	Referenzen
Hif-1 Hypoxia Inducible Factor 1	5'-RCTGT-3'	Semenza et al. 1996 Camenisch et al. 2001 Fink et al. 2002 Miyazaki et al. 2002
Has Hif Ancillary Sequence	5'-CAGGT-3'	Kimura et al. 2001
Epo-Box Erythropoietin-Box	5'-CACAG-3'	Semenza und Wang 1992 Fink et al. 2002 Miyazaki et al. 2002
Epo-like Erythropoietin-Box-like	5'-CACTG-3'	Palmer et al. 1998

Von Bindestellen mit funktioneller Relevanz ist bekannt, dass sie v.a. dann stark aktiv sind, wenn sie über Spezies hinweg konserviert vorliegen. Für das Neuroglobingens wurde zwischen Maus und Mensch kein konserviertes HRE gefunden (Wystub et al. 2004). Auch der Vergleich zwischen *Spalax* und Ratte, der in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ergab keine Konservierung von HREs in diesem Rodentia-Vergleich (Abbildung 4-3 B). Da jedoch in Anbetracht der unterschiedlichen Hypoxietoleranz von Ratte und *Spalax* auch die genregulatorischen Sequenzen verändert sein dürften, wurde allein die *Spalax*-Sequenz auf HREs hin durchsucht. Diese Suche nach HRE-Motiven, die nur in *Spalax* vorkommen,

DISKUSSION

brachte ein sehr gut passendes HRE im 5'UTR des Ngbs hervor (Abbildung 4-3 A), das innerhalb von 17 Bp aus zwei invertierten Hif-1-Bindestellen sowie einer Epo- und einer Epo-like-Box besteht. Eine genauere Betrachtung ergab, dass dieses HRE in Maus und Ratte nicht vorkommt, jedoch in Mensch und Hund verändert vorliegt (Abbildung 4-4). Mensch und Hund besitzen zwar ebenfalls zwei invertierte Hif-Konsensussequenzen, jedoch ohne die beiden akzessorischen Hilfsbindestellen in unmittelbarer Nähe wie *Spalax*. In der Ratte gibt es nur zwei einzeln liegende Hif-1 Bindestellen im Bereich 1000 Bp stromaufwärts des Startkodons, die jedoch kein HRE ergeben. In der 5'UTR/Promotor-Sequenz 1000 Bp stromaufwärts des Maus Ngbs befindet sich eine einzige Hif-1 Bindestelle, die ebenfalls mit einer einzelnen Epo-like Box assoziiert ist. Sollten diese HREs überhaupt aktiv sein, so wäre aufgrund des Sequenzvergleichs die potenzielle Stärke des HREs in *Spalax* wahrscheinlich höher als in den anderen untersuchten Spezies.

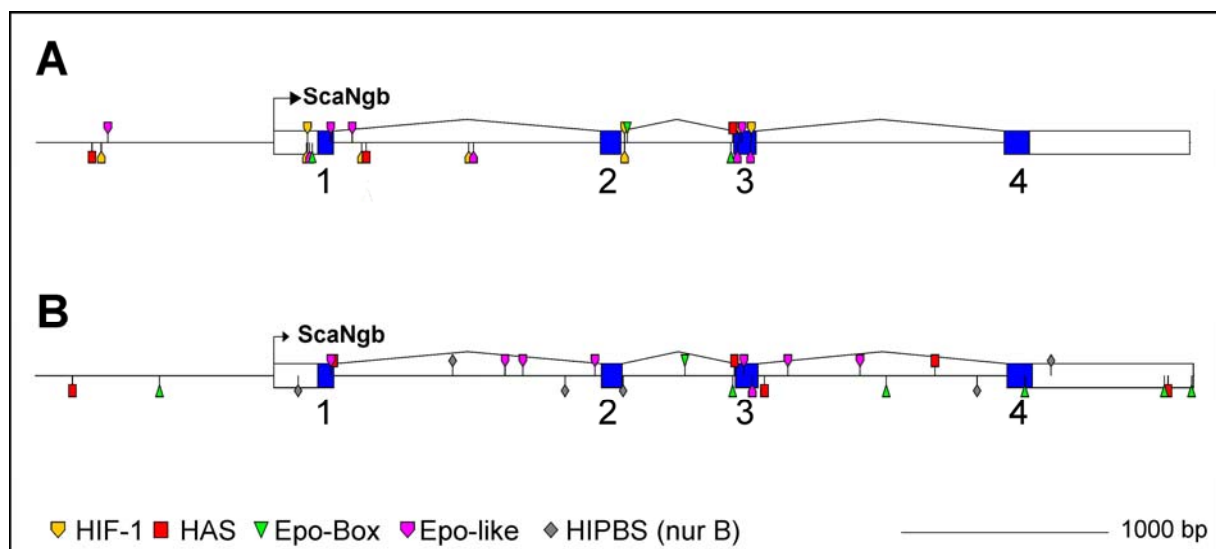


Abbildung 4-3: (A) Abbildung der in *Spalax* vorkommenden *Hypoxia responsive elements* (HREs) des Neuroglobins aus *S. carmeli* ($2n=58$). Voraussetzung für ein HRE ist das Vorkommen einer Hif-1 Bindestelle mit einem in der Entfernung von maximal 50 Bp liegenden ergänzenden Sequenzmotiv (Has: Hif ancillary sequence). (B) Hif-1- und ergänzende Bindestellen, die zwischen *Spalax* und Ratte konserviert vorliegen. Diese Bindemotivkonservierung ist ein Zeichen für ihre funktionelle Relevanz (Wystub et al. 2004).

Wie zuvor diskutiert, ist das *Spalax* Ngb-Gen schon unter Normoxie konstitutiv höher exprimiert als im Gehirn der Ratte. Das kann auf Ebene der Genregulation den Grund haben, dass der Promotor von *Spalax* eine höhere basale Aktivität hat. Das in *Spalax* vorkommende, potenziell „starke“ HRE könnte sehr wohl dafür verantwortlich sein, einen höheren konstitutiven Level schon unter normoxischen Bedingungen in *Spalax* aufrecht zu erhalten.

DISKUSSION

Wie Shams et al. (2004) zumindest für die Niere beschreiben, hat *Spalax* schon unter normalen Sauerstoffbedingungen etwa 2,5-fach mehr Hif-1 α mRNA als die Ratte. Sollte dies auch für das Hif-1 α Protein im Gehirn zutreffen, könnte man die konstitutiv höhere Expression relativ leicht erklären: Ein höherer Hif-1 Proteinlevel unter Normoxie wäre in *Spalax* also der Auslöser für die höhere Expression von Ngb. Der Test auf eine höhere Expression von Hif-1 Protein im Gehirn von *Spalax* wurde von mir durchgeführt. Jedoch hat der im Western Blot eingesetzte anti-HIF-1 α Antikörper das Protein weder in normoxischen noch in hypoxischen Proben von Ratte und *Spalax* erkannt (Daten nicht gezeigt).

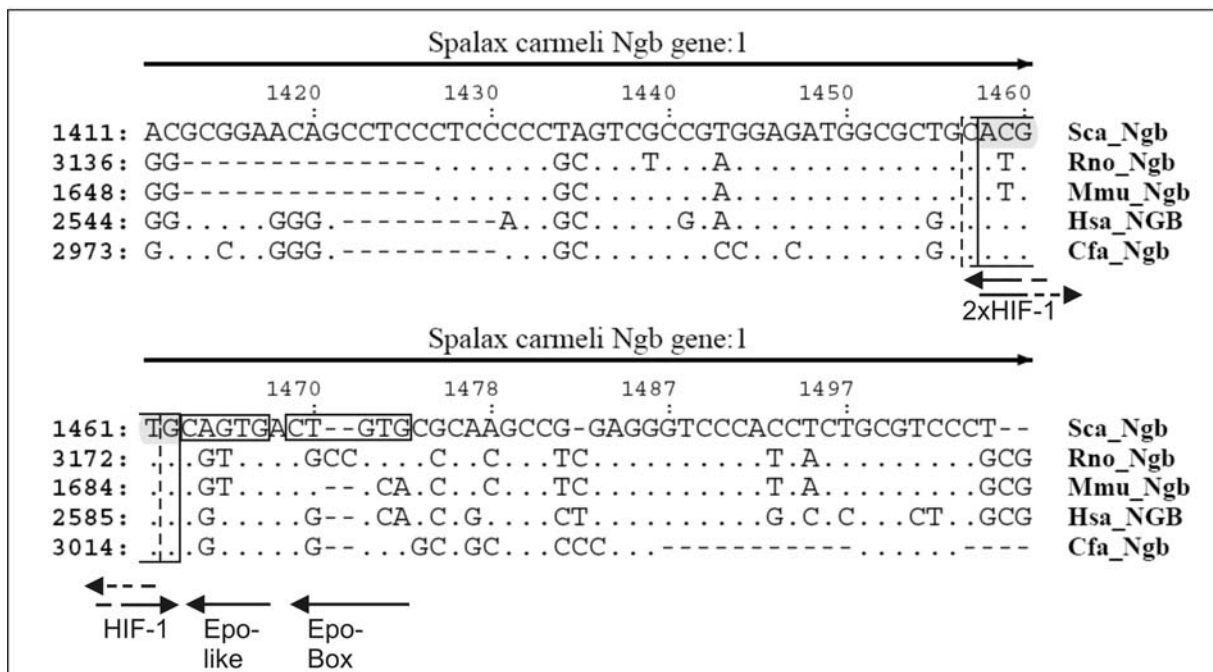


Abbildung 4-4: Das Hypoxie-responsive Element ist in *Spalax* durch das Vorkommen zweier gegeneinander invertierter Hif-1-Bindestellen sowie einer Epo- und Epo-like Box stärker ausgeprägt, als in den orthologen Genen der anderen untersuchten Spezies. Man kann erkennen, dass zwischen *Spalax*, Mensch und Hund die beiden invertierten Hif-1 Bindestelle konserviert vorliegen, nicht jedoch die akzessorischen Bindestellen Epo-like-Box und Epo-Box.

Die Herunterregulation von Neuroglobin unter Hypoxie scheint auf den ersten Blick nicht mit dem Vorkommen von HREs im Neuroglobin vereinbar zu sein. Von der Hif-Signalkaskade ist schon lange bekannt, dass sie die Expression von Genen ankurbelt, die in die Hypoxietoleranz involviert sind (Wang und Semenza 1993a, 1993b). Erst kürzlich jedoch hat man herausgefunden, dass es auch bestimmte Zielgene gibt, die durch Hif-1 bei Säugetieren bzw. durch sein *Drosophila* Orthologes Sima/Arnt gezielt herunterreguliert werden (Narravula und Colgan 2001; Mazure et al. 2002; Gorr et al. 2004).

DISKUSSION

Sollte es sich in zukünftigen Versuchen bewahrheiten, dass sowohl der Promotor aus der Ratte als auch der aus *Spalax* gleich aktiv sind, wäre eine Erklärung des gefundenen quantitativen Expressionsunterschiedes über eine unterschiedliche Halbwertszeit der Ngb-mRNAs möglich. Dazu wurde in der Gensequenz neben den Hypoxie-responsiven Elementen auch nach mRNA-stabilisierenden Motiven gesucht, wodurch ein höherer RNA- und Proteinlevel resultieren könnte. Von anderen Autoren wurde gezeigt, dass die mRNAs diverser hypoxie-responsiver Gene durch das Vorkommen von HIPBS-Sequenzmotiven (**Hypoxia-Inducible Protein Binding Sites**) stabilisiert werden können (Czyzyk-Krzeska und Beresh 1996; Scandurro und Beckman 1998). Das war der Anlass, dass auch die Sequenz sowohl nach konservierten HIPBS durchsucht wurde als auch nach der absoluten Anzahl dieser Bindestellen in verschiedenen Spezies. Es wurden diverse konservierte HIPBS Bindestellen (Abbildung 4-3 B) gefunden, die zur Stabilisierung der Ngb mRNA beitragen könnten. Die Wirksamkeit dieser HIPBS-Bindestellen muss jedoch experimentell durch Deletionsmutanten geklärt werden. Eine Aussage, ob die *Spalax*-spezifische höhere Expression schon unter normoxischen Bedingungen alleine durch das Vorhandensein einer höheren Anzahl an mRNA-stabilisierenden Elementen erklärbar ist, könnte über die absolute Anzahl an HIPBS Bindestellen geklärt werden. Alle untersuchten Nagetiere (*Spalax*, Ratte und Maus) haben in der orthologen Region des Ngb-Gens 27 bzw. 28 (nicht konservierte) HIPBS, der Mensch hingegen hat 38 und der Hund 23. Das verstärkte Vorkommen von Ngb-mRNA in *Spalax* gegenüber Ratte ist also zumindest nicht durch eine höhere Anzahl von HIPBS-Motiven erklärbar.

Es handelt sich nach unseren Ergebnissen bei Ngb weder in *Spalax* noch in der Ratte um ein unter Hypoxie hochreguliertes Gen. In der vorhandenen Literatur scheint es keinen Konsens über die Regulation von Ngb unter Hypoxie zu geben (Burmester et al. 2008). Gehirne von Maus und Ratte wurden für verschiedene Zeiten (von 5 h bis zu 2 Wochen) unter Sauerstoffkonzentrationen von 6 bis 12 % gehalten und zeigen hochvariable Ergebnisse. Mammen et al. (2002) sowie Hundahl et al. (2005) haben keine Unterschiede der Ngb-mRNA-Level zwischen normoxischen und hypoxischen Tieren gefunden. Drei andere Studien haben eine Hochregulation um Faktor 1,3-3 von Ngb unter Hypoxie zum Teil auch auf Proteinebene gefunden (Fordel et al. 2006; Li et al. 2006; Fordel et al. 2007). Ob die unterschiedlichen Ergebnisse auf abweichender Durchführung der Experimente, Datenanalyse oder Tierstämmen beruhen, ist nicht zu klären (Burmester et al. 2008).

4.1.4 Die möglichen Funktionen des Neuroglobins

Bis vor wenigen Jahren ist man davon ausgegangen, dass die starke Vaskularisierung des Gehirns alleine ausreicht, genügend Sauerstoff bereit zu stellen, um eine ausreichende Energieversorgung des Gehirns zu ermöglichen. Das Gehirn ist zusammen mit dem Herzen wohl das Sauerstoff-sensitivste Organ der Vertebraten. Hypoxiesensitive Stellen des Gehirns wurden v. a. im Thalamus, Hypothalamus, Pons und der Medulla beschrieben (Dawes et al. 1983; Martin-Body und Johnston 1988; Horn und Waldrop 1997; Koos et al. 1998; Solomon et al. 2000; Sun und Reis 1994; Neubauer und Sunderram 2004). Dies korreliert sehr gut mit der Expression von Ngb. Auf Protein- und mRNA-Ebene wurde für den Thalamus und den Hypothalamus Ngb-Expression gefunden, sowie auf mRNA Ebene auch in der Medulla. Das Gehirn ist nicht in der Lage, seinen Energiebedarf über die Glykolyse oder auch anschließende Gärung zu decken, wie es z. B. in Muskelzellen der Fall ist. Das Gehirn benötigt also molekularen Sauerstoff für den oxidativen Stoffwechsel. Dieser Sauerstoff dient als Elektronenakzeptor in der Atmungskette der Mitochondrien, was zur Bereitstellung des Energieäquivalents ATP (Adenosin-tri-Phosphat) führt. Der Sauerstoffpartialdruck im Gehirn liegt in verschiedenen Regionen bei minimalen Werten von 1-3 Torr, durchschnittlich jedoch bei 10-20 Torr (Erecinska und Silver 2001).

Im Folgenden sollen nun die potenziellen Funktionen von Ngb, die von anderen Globinen wie dem Myoglobin bekannt sind, in Zusammenhang mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen gebracht werden.

4.1.4.1 Neuroglobin als Sauerstoffspeicher und -transporter?

Der zwischenartliche Vergleich der Ngb-Expression im Gehirn unter normalen Sauerstoffbedingungen unterstützt eine Sauerstoffspeicherfunktion. Es wurden in beiden untersuchten *Spalax*-Arten größere Ngb-Mengen gefunden als in der Ratte (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6). Eine höhere Expression eines Sauerstoffspeicherproteins in einem subterranean Nagetier ist somit unter alltäglichen Bedingungen sinnvoll, um hypoxischen Bedingungen besser entgegen treten zu können. Diese verstärkte Expression ist also wahrscheinlich eine Präadaptation sowohl an plötzlich auftauchende, starke Hypoxie z. B. in Zeiten einer Überschwemmung nach starken Regengüssen als auch an länger andauernde, chronische Hypoxie in den schlecht durchlüfteten Höhlengängen, in denen *Spalax* lebt (siehe dazu auch 4.1.3). Die größere Verfügbarkeit von Sauerstoff im Gehirn unter Normoxie könnte also im Fall von (plötzlich) auftretender Hypoxie dafür sorgen, dass schon zu Beginn der

DISKUSSION

Hypoxie mehr O₂ verfügbar ist als z. B. bei der Ratte. Sehr ähnliche Ergebnisse wurden auch schon bei Untersuchungen des Myoglobins von anderen stark hypoxietoleranten Säugern erhalten. Bei der Analyse der Myoglobin-Konzentrationen in lokomotorischen Muskeln von drei Robbenarten kam heraus, dass die Art, die am längsten tauchen kann (*Halichoerus grypus*), auch höhere Mb-Level hat (54 ± 4 mg Myoglobin pro g Muskelmasse) als die beiden anderen Arten, die nur kürzer tauchen können (*Phoca vitulina* [41 ± 4 mg/g] und *Arctocephalus gazella* [24 – 31 mg/g]). In allen drei tauchenden Robben ist der Myoglobingehalt weitaus höher als in der damit verglichenen Ratte ($2 \pm 0,1$ mg/g) (Reed et al. 1994). Andere Untersuchungen zeigen, dass die Weddell-Robbe (*Leptonychotes weddelli*), die ebenfalls lang andauernde Tauchgänge durchführt, im Vergleich zum Hund einen um Faktor 9 bis 13 erhöhten Myoglobinlevel hat (Kanatous et al. 2002). Weiterhin zeigt diese Untersuchung jedoch, dass bei der Robbe, anders als beim Menschen, nicht der oxidative Stoffwechsel über die Atmungskette zunimmt, sondern dass es besondere Mechanismen gibt, einen aeroben Lipid-basierten Stoffwechsel durchzuführen. Besonders unter hypoxischen Bedingungen, die bei langen Tauchgängen entstehen, spielt dieser Stoffwechselweg eine Rolle (Kanatous et al. 2002).

Betrachtet man die Expression von Ngb unter Hypoxie, die in der Blindmaus und in Ratte absinkt und nimmt eine Funktion als Sauerstoffspeicher an, so wäre diese folgendermaßen zu erklären: Es gibt ein Gleichgewicht zwischen dem im Zytosol gelösten und dem an Ngb gebundenen Sauerstoff gibt. Würde nun das Ngb verstärkt exprimiert, so würden dem Zytoplasma immer mehr gelöste O₂-Moleküle entzogen bzw. weggefangen werden und somit nicht mehr für die Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles hin zu den Mitochondrien zur Verfügung stehen. Ein Nachschub an O₂ aus dem Blut ist in diesem Fall stark verlangsamt, da auch im Blut Hypoxie herrscht. Je mehr Ngb-Moleküle also unter Sauerstoffmangel in den Zellen gebildet würden, desto mehr würde der noch in der Zelle vorhandene Sauerstoff abgefangen werden und folglich nicht mehr der mitochondrialen Atmungskette zur Verfügung stehen. Diese Erklärung passt also zu der Herunterregulation von Ngb unter Hypoxie. Diese Hypothese hängt jedoch stark vom O₂-Partialdruck bei Halbsättigung (P₅₀), also der Affinität des Proteins ab. Die Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben für Ngb einen P₅₀-Wert von 1 bis 2 Torr ergeben (Burmester et al. 2000; Dewilde et al. 2001; Hankeln et al. 2005). Eine andere Arbeitsgruppe hat für Ngb unter physiologischen Bedingungen eine Sauerstoffaffinität von etwa 8 Torr gemessen (Fago et al. 2004). Höhere P₅₀-Werte bedeuten eine niedrigere Sauerstoffaffinität des Proteins. Nach

DISKUSSION

Erecinska und Silver (2001) liegt der P_{50} -Wert für Sauerstoff in unterschiedlichen Regionen des Rattengehirns zwischen 1 und 60 Torr. Das würde bedeuten, dass in vielen Bereichen des Gehirns ein beachtlicher Teil des Ngbs unter Normoxie noch mit Sauerstoff gesättigt wäre und diesen erst bei Hypoxie abgeben würde. Mit einer einfachen Sauerstoffspeicherfunktion von Ngb unter normoxischen Bedingungen sind die erhaltenen Ergebnisse also kompatibel. Ob die Konzentration an Ngb jedoch ausreicht, um als Speicher von Sauerstoff zu dienen, bleibt weiter fraglich.

Eine O_2 -Transportfunktion von Ngb hin zu den Mitochondrien („facilitated diffusion“, Wittenberg und Wittenberg 2003) ist eher unwahrscheinlich und mit der Herunterregulation des Ngbs nicht so leicht vereinbar. Das wichtigste Gegenargument ist die geringe Ngb-Konzentration im Gehirn. Mb, das im Muskel die Diffusion erleichtert, liegt dort in etwa 100-fach stärker konzentriert vor. Diese Menge ist notwendig, um genügend O_2 -Moleküle zu binden (Schmidt et al. 2003). Für diese Funktion würde es in der Tat mehr Sinn machen, unter hypoxischen Bedingungen mehr Transportermoleküle zur Verfügung zu haben, vorausgesetzt, das Entladen der Moleküle erfolgt in Mitochondriennähe. Dort konnte jedoch ein verstärktes Vorkommen von Ngb nicht gefunden werden (Untersuchungen von Tilmann Laufs, Institut für Molekulargenetik, Universität Mainz).

Betrachtet man die Konzentration von Ngb im Gehirn so ist es höchst fraglich, ob die Menge an Ngb und somit O_2 überhaupt ausreichen würde, den hohen Sauerstoffverbrauch von Neuronen hinreichend zu unterstützen. Bei der Ngb-Konzentration im Gehirn handelt es sich um eine etwa 100-fach geringere Menge an Protein, wie bei Myoglobin im Muskel, das als Sauerstoffspeicher dient. Es ist fraglich, ob das bis zu maximal 3-fach stärkere Vorhandensein von Ngb im Gehirn von *Spalax* vs. Ratte der Blindmaus einen Vorteil im Hinblick auf Sauerstoffverfügbarkeit im Gehirn bringt. Selbst eine Verzehnfachung wäre vermutlich für eine Sauerstoffspeicherfunktion nicht ausreichend. Damit ist also nur in Regionen höherer Ngb-Konzentration eine temporäre, limitierte Speicherfunktion denkbar. In der Retina hingegen herrschen Ngb-Konzentrationen, die denen des Myoglobins im Muskel entsprechen (Schmidt et al. 2003), die mit einer Sauerstoffspeicherfunktion in Einklang zu bringen sind (vgl. 4.1.4.4).

4.1.4.2 Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Freie Radikale und andere reaktive Sauerstoffspezies werden im Körper ständig gebildet. Oftmals erfüllen sie nützliche metabolische Aufgaben (Halliwell und Cross 1994), können in

DISKUSSION

hoher Konzentration jedoch aufgrund ihrer Reaktivität, die durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen des Moleküls oder Atoms entsteht, auch zelluläre sowie subzelluläre Schädigungen herbeiführen. Antioxidanz-Enzyme schützen die Zelle davor, sind jedoch nicht ausreichend, Schädigungen, die durch starken oxidativen Stress hervorgerufen werden, komplett zu verhindern. Geschädigt werden Lipide, Proteine und DNA, was z. B. zu DNA-Strangbrüchen führen kann oder den Calcium-Ionen Haushalt stört (Halliwell und Cross 1994). Daher bedarf es Reparaturmechanismen, die Schädigungen erkennen und rückgängig machen. Das Vorkommen bzw. die Entstehung verschiedener Formen reaktiven Sauerstoffs im Körper sowie dem dadurch für die Zelle ausgelösten Stress wird als oxidativer Stress bezeichnet. Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies ist jedoch nicht einzig und alleine Folge eines Überangebotes von O₂, sondern ihre Entstehung kann auch durch Hypoxie hervorgerufen werden. Die ROS-Entstehung unter Hypoxie erfolgt v.a. dann, wenn ein hohes reduzierendes Potenzial in der Zelle herrscht (hohes NADH+H⁺:NAD⁺-Verhältnis) und auch trotz Hypoxie noch ausreichend Sauerstoff in der Zelle vorhanden ist, damit ROS entstehen können (Halliwell 2006; Clanton 2007). Clanton (2007) beschreibt auch, dass es im Skelett- und Herzmuskel in frühen Phasen der Hypoxie eine vorübergehende Erhöhung des ROS-Levels gibt, wohingegen chronische, starke Hypoxie zur anhaltenden ROS-Produktion führt. Möchte man die Funktion von Globinen also in Hinblick auf die Entgiftung von Sauerstoffspezies diskutieren, wäre eine verstärkte Expression des Proteins, sowohl nach extremer Hypoxie als auch nach experimenteller Hyperoxie, die durch erhöhte O₂-Konzentrationen in der Außenluft intrazellulär ROS bildet, zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurden in *Spalax* und Ratte hypoxische Zustände herbeigeführt, die zumindest in der Ratte (5 h, 6 % O₂) zu extremem Sauerstoffmangel führte. Also sollte es im Fall eines Proteins, das ROS entgiftet, zu einer verstärkten Expression nach starker Hypoxie kommen. Es wurde kürzlich gezeigt, dass Myoglobin im Muskel bzw. im Herzen in der Lage ist, reaktives Superoxid (Flögel et al. 2004) sowie NO (Flögel et al. 2001) zu beseitigen. Diese Befunde passen zu den Ergebnissen der Regulation des Myoglobins, die in dieser Arbeit untersucht wurde. Die Mb-mRNA ist im Skelettmuskel ausschließlich in stark hypoxisch gehaltenen Ratten (5 h, 6 % O₂) hochreguliert (Abbildung 3-19). Andere Arbeiten zeigen hingegen, dass unter verringerten Sauerstoffbedingungen eine Hochregulation von Mb erfolgt und auch Sinn macht, um die Sauerstoffverfügbarkeit zu erhöhen (Hoppeler und Vogt 2001). Es konnten im Beinmuskel von Radsportlern z. B. höhere Myoglobin-Konzentrationen gefunden werden, wenn sie unter hypobarischer Hypoxie trainierten, im Vergleich zu Radfahren die im Flachland trainierten (Terrados et al. 1990). Sollte es auch in *Spalax* unter

DISKUSSION

Hypoxie zur Bildung von ROS im Skelettmuskelgewebe kommen, so reicht wahrscheinlich das in *Spalax* schon unter Normoxie um mehr als Faktor 25 verstärkt exprimierte Mb dazu aus, um ROS wegzufangen. Vergleicht man die Expression von Mb mit der von Ngb, so stellt man fest, dass Ngb unter keinem der untersuchten Zustände oder in einer der drei Spezies hochreguliert wird. Für Ngb gibt es also bislang keine Hinweise, dass ROS, die unter akuter Hypoxie entstehen können, entgiftet werden.

Auch die Diplomarbeit von Dreidax (2006), die sich mit der Untersuchung u.a. von Ngb nach experimenteller Hyperoxie beschäftigt hat, zeigt keine unterschiedlich starke Expression zwischen normoxischen und hyperoxischen (24 h, 85 % O₂) Tieren. Somit ist nach den vorliegenden Daten eine ROS-Entsorgungsfunktion von Ngb unwahrscheinlich. In einer weiteren Diplomarbeit (Schülke 2007) wurden Enzyme untersucht, die ROS unschädlich machen können. Eine ganze Reihe von Antioxidantiengenenen wurden schon im normoxischen Vergleich verstärkt exprimiert: Glutathion-Peroxidase (Gpx1), Glutathion-S-Transferase (Gst), Glutathion-S-Reduktase (Gsr), Häm-Oxygenase (Hmox1) in Gehirn, Herz und Leber, sowie Katalase (Cat) in Gehirn und Leber wurden alle mehr oder weniger stark in *S. galili* (2n=52) und *S. judaei* (2n=60) im Vergleich zur Ratte konstitutiv stärker exprimiert. Das heißt, dass Ngb in dieses „Ensemble“ passt, was indirekt für eine ROS-Entgiftungsfunktion sprechen könnte.

4.1.4.3 NO-Dioxygenase Funktion

Von Myoglobin weiß man, dass es auch eine Funktion als NO-Dioxygenase wahrnehmen kann (Flögel et al. 2001). Dabei wird schädliches, überschüssiges Stickstoffmonoxid in harmloses Nitrat umgewandelt. Eine indirekte Untersuchung dieser Funktion war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur insoweit möglich, als dass die am Auge von *Spalax* durchgeführten Arbeiten kein ähnliches Expressionsmuster zwischen neuraler NO-Synthase (nNOS), die die Produktion von NO bewirkt, und Ngb zeigen (Abbildung 3-26; Abbildung 3-21). Auch Reuss et al. (2002) sahen keine strikte Kollokalisierung zwischen Ngb-mRNA und nNOS in verschiedenen Geweben. Sowohl Brunori et al. (2005) als auch Herold und Fago (2005) beschreiben hingegen, dass oxygeniertes Ngb sehr schnell mit NO reagiert. Über das Zwischenprodukt Peroxinitrit, welches ebenfalls an das Häm gebunden ist, entsteht unschädliches Nitrat (NO₃⁻). Diese Reaktionsmechanismen erfordern die Anwesenheit einer Reduktase, weil Ngb eine große Tendenz zur Autoxidation besitzt Fago et al. (2006).

DISKUSSION

4.1.4.4 Neuroglobin in der Retina der Blindmaus: Rückschlüsse auf die Basisfunktion

Die immunhistochemischen Versuche, die an der Retina von Maus, Ratte und Meerschweinchen durchgeführt wurden (Bentmann et al. 2005), zeigen, dass es in diesen Spezies eine Beziehung zwischen Ngb und mitochondrialer Atmungskette gibt. Ngb befindet sich in allen drei Spezies genau in den Schichten, in denen auch Cytochrom c, Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, in großem Maße exprimiert wird, also genau dort, wo der Sauerstoffverbrauch durch die aerobe Atmung am höchsten ist. Neuroglobin befindet sich also an den Orten hohen Sauerstoffverbrauchs und ist dort u. U. für eine erleichterte Diffusion zuständig. In *Spalax* gibt es Ngb-Expression in den gleichen Schichten wie in Ratte und Maus (beide besitzen wie *Spalax* eine vaskuläre Retina) (vgl. 3.1.4.1). Die Stärke der Expression ist in der Blindmaus jedoch bei weitem nicht so stark wie in den sehfähigen Vergleichstieren (vgl. auch mRNA Daten in Abbildung 3-23). Auch der Nachweis von Cytochrom c zeigt eine reduzierte, eher diffuse Immunfärbung, verglichen mit den diskontinuitlichen, stark gefärbten Schichten bei Ratte, Maus und Meerschweinchen. Die allgemein schwächere Expression der beiden Proteine ist möglicherweise direkt auf den Funktionsverlust im Spalaxauge zurückzuführen. Starke Cytochrom c-Färbung kann man v. a. in der Photorezeptorschicht erkennen (Abbildung 3-22). Gerade dort ist der Sauerstoffverbrauch am höchsten. In der Nähe, unmittelbar außerhalb des retinalen Pigmentepithels, das sich an die Photorezeptorschicht anschließt, verlaufen Gefäße, sodass genügend Sauerstoff zu den Orten des Verbrauchs (Photorezeptorschicht) diffundieren kann, ohne dass es notwendig wäre, die Diffusion durch Ngb zu erleichtern. In der Ganglienzellschicht verhält es sich anders. Hier ist der Sauerstoffverbrauch, wie in den inneren Segmenten der Photorezeptorschicht, ebenfalls sehr hoch, aber es befinden sich in der Nähe keine Gefäße. Das führt dazu, dass die Diffusionsstrecke von den Gefäßen, die sich in der äußeren plexiformen Schicht befinden (Abbildung 3-24), hin zu der Ganglienzellschicht zu weit ist, als dass ausreichend Diffusion erfolgen könnte. Daher wird durch Ngb in den Ganglienzellen die Sauerstoffverfügbarkeit u. U. durch eine erleichterte Diffusion erhöht. Für eine Funktion bei der erleichterten Diffusion im Auge spricht auch, dass dort die Ngb-Konzentration bei Maus und Ratte so hoch ist, wie die Mb-Konzentration im Muskel (50-100 μM ; Schmidt et al. 2003), also etwa 100-fach höher als im Gehirn (Burmester et al. 2000). Diese hohen Konzentrationen und die leicht verstärkte Expression unter Hypoxie (zumindest auf mRNA-Ebene) v. a. in der Ratte (Abbildung 3-23) passen auch zur angenommenen Funktion als Protein, das die Sauerstoffdiffusion erleichtert. Fordel et al. (2007) berichten ebenfalls von einer um ca. Faktor 2 verstärkten Expression von Ngb im Auge der Maus. Höhere Ngb-Level unter

DISKUSSION

Hypoxie im Auge bedeuten also, dass weite Wege von den Kapillaren hin zu den Orten des Verbrauchs besser überwunden werden können.

4.1.4.5 Neuroglobin in Gliazellen – ein allgemeines Merkmal hypoxieresistenter Lebewesen

Eine Neuigkeit, die zuvor nur in der hypoxietoleranten Robbe entdeckt wurde (Folkow et al., eingereicht), ist, dass Neuroglobin in *Spalax* zum Teil auch in Gliazellen bzw. Astrozyten vorkommt. Die Expression in Gliazellen könnte dafür verantwortlich sein, dass sowohl bei qRT-PCR- als auch Western-Blot-Genexpressionsanalysen mehr Ngb im Gehirn von *Spalax* als im Gehirn der Ratte nachgewiesen wurde. Schon vor über 40 Jahren wurde entdeckt, dass im Nervengewebe von Invertebraten Hämoglobine v. a. in Gliazellen vorkommen (Wittenberg et al. 1965). Dies wurde auch für die Nervenglobine der Mollusken *Tellina alternata* (Kraus und Colacino 1986) sowie *Spisula solidissima* (Doeller und Kraus 1988) beschrieben. Beide Hämoglobine können selbst unter O₂-Mangel eine ausreichende Versorgung der Nerven für bis zu 30 Minuten sicherstellen. Funktionsuntersuchungen bei *Tellina* (Kraus und Colacino 1986) zeigen, dass das Nerven-Globin in diesem Organismus offenbar für die effiziente Erregungsleitung der Nervenzellen wichtig ist. Das Globin besitzt ebenfalls eine hohe Sauerstoffaffinität (P₅₀=1,3 Torr) und wird in Glia-Zellen des Rückenmarks, nicht jedoch in Neuronen exprimiert (Wittenberg 1992).

Eine Annahme ist, dass der oxidative Metabolismus im Spalaxgehirn teilweise von den Neuronen hin zu den Gliazellen verschoben wurde, was bedeutet, dass das Vorkommen von Ngb in Gliazellen die Nervenfunktion unter Hypoxie aufgrund der O₂-Versorgung verbessern könnte. Ein ähnliches Phänomen wurde auch bei Langusten beobachtet (Hargittai und Lieberman 1991). Hier wurde an einzelnen isolierten Neuronen mit umgebender glialer Schwann'scher Scheide festgestellt, dass abhängig von den experimentellen Bedingungen der Sauerstoffverbrauch der Gliazellen zwischen 30 % und fast 100 % liegt. Die Autoren schätzten, dass 90 % des Sauerstoffs im Gewebe von den Gliazellen verbraucht wird. In hypoxiesensitiven Säugern arbeiten Gliazellen in der Regel anaerob, wodurch es zur Entstehung großer Mengen von Laktat kommt (Itoh et al. 2003). Dieses Laktat wird dann von Neuronen aufgenommen, die die Präferenz haben, dieses Laktat zu oxidieren und nicht Laktat/Pyruvat über die eigene Glykolyse zu produzieren.

Im Neuroglobingen der Maus und des Menschen sind Sequenz-Elemente vorhanden, die dafür sorgen, dass es zu einer ausschließlich neuronalen Expression des Gens kommt (Laufs et al.

DISKUSSION

2004). Diese Elemente heißen „*neuron-restricted-silencer-elements*“ (NRSE) (Schoenherr und Anderson 1995; Schimojo et al. 2001) und sind 21 bp lange Kontrollmotive, die entweder „stromab- oder -aufwärts“, in Introns oder Exons von Genen, unabhängig von ihrer Orientierung, positioniert sein können (Schoenherr et al. 1996; Thiel et al. 1998). Für *Spalax* würde man erwarten, dass diese Elemente im Neuroglobin nicht vorhanden sind. Genau dieses Ergebnis wurde auch erreicht, als die Ngb-Gensequenzen der verschiedenen *Spalax*-Spezies auf das Vorkommen von NRSEs, entsprechend der Vorgaben in Laufs et al. (2004), mit Hilfe des Programms MSCAN getestet wurden. Dieser Sachverhalt kann also die in *Spalax* vorkommende, nicht strikt in Neuronen befindliche Expression erklären.

4.2 Das Cytoglobin in *Spalax*

4.2.1 Interspeziesvergleich von Cytoglobin: Wenige Hinweise auf eine Sequenzadaptation

Die Größe des Cytoglobins in allen *Spalax*-Spezies beträgt wie in den anderen bisher untersuchten Mammaliern 190 Aminosäuren (Abbildung 4-5). Verglichen mit den anderen Globinen Mb, Hb und Ngb zeigt Cytoglobin strukturelle Unterschiede, die v. a. in den N- und C-terminalen Bereichen gefunden werden können. Den Cytoglobinen aus Fischen und Amphibien fehlen C-terminale Verlängerungen, so dass die Länge im Bereich von ca. 174 bis 179 Aminosäuren liegt (Burmester et al. 2004). Einige Fische aber haben in ihrem zweiten Cygb zusätzliche Aminosäuren im N-terminalen Bereich. Dennoch weist Cygb strukturelle Verwandtschaft zu den anderen Globinen auf, die mit der klassischen „drei-über-drei“ alpha-helikalen Globin-Faltung in Einklang gebracht werden kann (de Sanctis et al. 2004). Die wichtigsten strukturellen und funktionellen Merkmale, wie das PheCD1 (Phenylalanin an Position 1 des Bereiches zwischen Helix C und D), HisE7 (Histidin an Position 7 der Helix E) und His F8 sind, wie bei den anderen untersuchten Spezies auch, in allen *Spalax*-Spezies vorhanden. Das bedeutet, dass es in Cygb auf struktureller Ebene wahrscheinlich keine Adaptationen an das Leben unter begrenzter Sauerstoffverfügbarkeit gibt. Dies wird unterstützt durch den Aminosäure-Sequenzvergleich, der nur ein geringes adaptives Potenzial beinhaltet. An Position 40 (Helix A) (Abbildung 4-5) zeigt das Alignment einen wahrscheinlich isofunktionellen Aminosäureaustausch von Asparaginsäure in *Spalax* und einigen (Karpfen-) Fischen hin zu Glutaminsäure in den anderen Vertebraten. Eine für *Spalax* jedoch einzigartige Aminosäure befindet sich in *S. galili* (2n=52) und *S. carmeli* (2n=58) an

DISKUSSION

den beiden Positionen 59 (Arginin anstelle von Glycin, Helix B) und 82 (Arginin anstelle von Histidin, Bereich zwischen Helix C und D), die beide eventuell nicht isofunktionell sind. Ob diese beiden Austausche tatsächlich Auswirkungen auf die Struktur haben, müsste in weitergehenden Strukturuntersuchungen erforscht werden. Eine Besonderheit findet sich an Position 104 (Helix E), in der alle Säugerspezies ein Glycin besitzen außer *S. judaei* (2n=60), das eine nicht-isofunktionelle Glutaminsäure besitzt. Die Nicht-Säuger-Spezies besitzen an dieser Stelle viele unterschiedliche Aminosäuren, was für eine Stelle mit eher geringerem Grad an funktioneller Konservierung spricht.

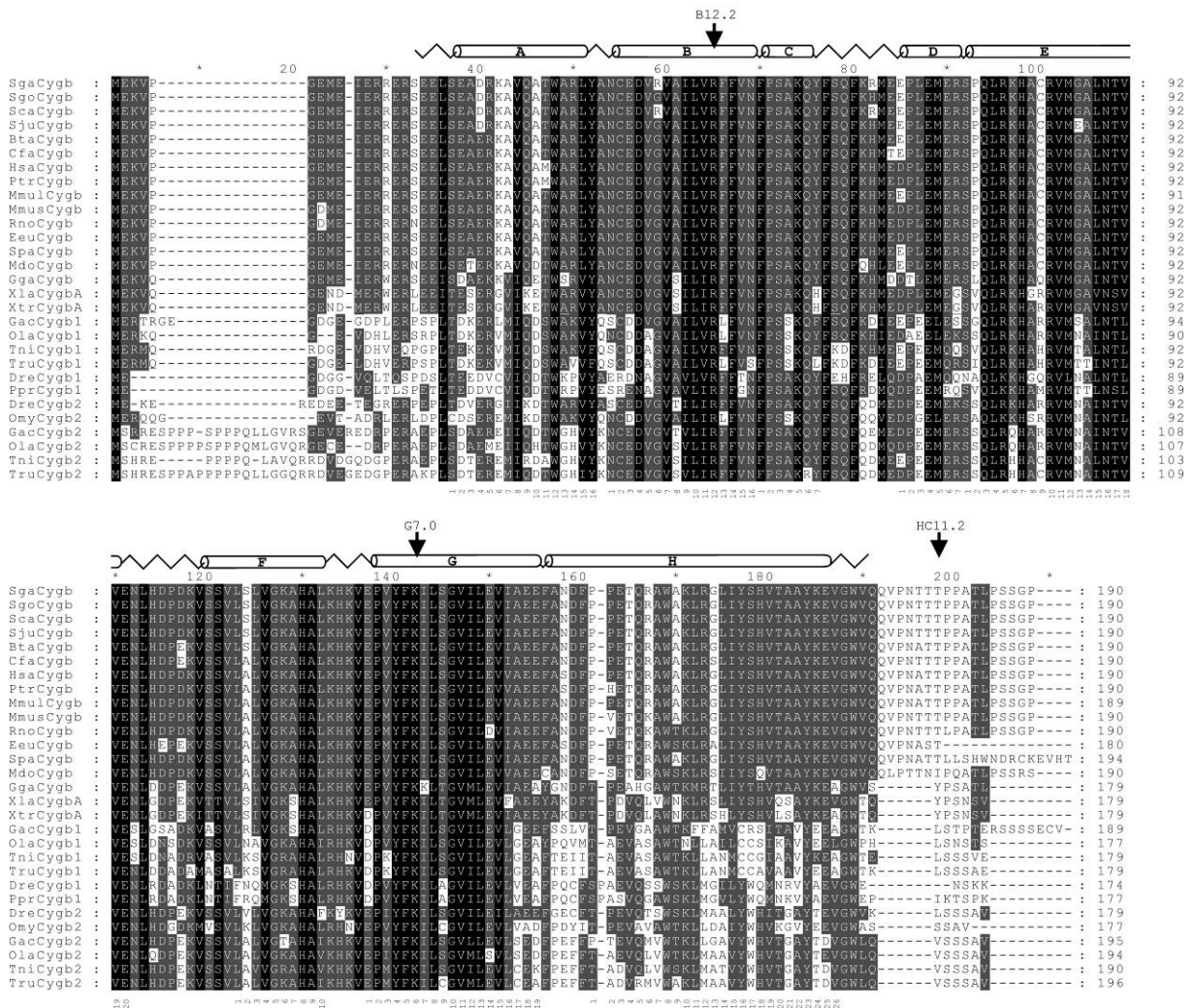


Abbildung 4-5: Cytoglobin Aminosäuresequenzvergleich verschiedener Vertebraten mit den vier israelischen *Spalax*-Spezies. Abkürzungen: Sga: *Spalax galili* (2n=52); Sgo: *Spalax golani* (2n=54); Sca: *Spalax carmeli* (2n=58); Sju: *Spalax judaei* (2n=60); Bta: *Bos taurus*; Cfa: *Canis familiaris*; Hsa: *Homo sapiens*; Ptr: *Pan troglodytes*; Mmul: *Macaca mulatta*; Mmus: *Mus musculus*; Rno: *Rattus norvegicus*; Eeu: *Echinus europaeus*; Spa: *Spermophilus parii*; Mdo: *Monodelphis domestica* (Haus-Spitzmausbeutelratte); Gga: *Gallus gallus*; Xia: *Xenopus laevis*; Xtr: *Xenopus tropicalis*; Gac: *Gasterostreus aculeatus*; Ola: *Oryzias latipes*; Tni: *Tetraodon nigroviridis*; Tru: *Takifugu rubripes*; Dre: *Danio rerio*; Ppr: *Pimephales promelas*; Omy: *Oncorhynchus mykiss*. Konservierte Sequenzpositionen von 100 % sind in weißer Schrift auf schwarzem Grund dargestellt, Bereiche, die über 50 % konserviert sind, sind auf grauem Grund abgebildet. Positionen mit unter 50 % Konservierung haben keine Schattierung.

4.2.2 Die Expression des *Spalax* Cytoglobins gibt ebenfalls Hinweise auf eine Adaptation an das Leben unter Hypoxie

Vergleicht man die Expressionsniveaus des Cytoglobins in der Ratte mit der der beiden *Spalax*-Arten, so zeigt sich, dass zumindest im Gehirn schon unter normalen Sauerstoffbedingungen von 21 % eine um etwa Faktor 2 bis fast 3 fach größere Menge mRNA (Abbildung 3-14 A) und Protein (Abbildung 3-15) in beiden *Spalax*-Arten vorhanden ist. Somit zeigt auch *Cygb* adaptives Potenzial in *Spalax* an das Leben unter begrenzter Sauerstoffverfügbarkeit. Dies scheint nicht für Herz und Leber zu gelten; in allen drei Spezies sind hier zumindest auf mRNA-Ebene gleiche *Cygb*-Level vorhanden (Abbildung 3-14 B und C). Unter Hypoxie scheint es ebenfalls eine Anpassung an den natürlicherweise in *Spalax* vorkommenden Sauerstoffmangel zu geben: Das *Cygb*-Gen wird im Gehirn nur in *Spalax* bis zu Faktor 6 hochreguliert, in dem Gehirn der Ratten hingegen gar nicht. Eine Präadaptation an das unterirdische hypoxische Leben scheint es im Herz von *S. galili* (2n=52) zu geben. Nur diese Art exprimiert das Gen um Faktor 12 hoch, verglichen mit der Normoxie. Ratte und *S. judaei* (2n=60) erreichen eine maximal verstärkte *Cygb* Expression im Herzen von fast Faktor 3 bzw. 4.

Für Cytoglobin wurde eine Expression in diversen Geweben beschrieben, u. a. in Gehirn, Herz und Leber. Im Gehirn kommt Cytoglobin in distinkten neuronalen Zellpopulationen vor, nicht nur zytoplasmatisch, sondern auch im Nukleus dieser Zellen (Schmidt et al. 2004). Eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation in Zellen ist z. B. in Herz und Leber gegeben. Die unterschiedlichen Färbemuster von neuronalen Zellen und Fibroblasten erlauben die Hypothese, dass *Cygb* in beiden Zelltypen unterschiedliche Funktionen haben könnte. Anders jedoch als bei Neuroglobin konnten bei der zellulären Expressionsuntersuchung mittels Immunhistochemie keine Unterschiede zwischen Ratte und der Blindmaus gefunden werden. Im den nachfolgenden Kapiteln wird versucht, eine Erklärung für die erhaltenen Expressionswerte unter Normoxie sowie Hypoxie zu finden.

4.2.3 Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen des *S. carmeli* (2n=58) Cytoglobingens

Auch für Cytoglobin (*Cygb*) wurde nach Hypoxie-responsiven Bindestellen (HREs) in der genomischen Sequenz von *S. carmeli* (2n=58) gesucht, um Hinweise auf einen aktiveren

DISKUSSION

Promotor unter Normoxie von *Spalax* verglichen mit Ratte zu erhalten. Weiterhin wurde das *Cygb*-Gen auch auf das Vorkommen mRNA-stabilisierender Motive hin untersucht.

Um die stärkere Expression unter Normoxie in *Spalax* erklären zu können, wurde nach HREs gesucht, die zwischen Ratte und *Spalax* konserviert vorlagen. Diese sollten vorab zeigen, welche HREs funktionsfähig sein könnten (Wystub et al. 2004). Betrachtet man zunächst die in Ratte und *S. carmeli* (2n=58) vorkommenden Hif-1-Bindestellen, so fällt auf, dass eine Vielzahl dieser konserviert vorliegt (Abbildung 4-6 B). An einigen Positionen des *Cygb*-Gens befinden sich in unmittelbarer Nähe der Hif-1-Bindesequenzen weitere Hif-1- bzw. akzessorische Hilfsmotive, die somit potenzielle HREs darstellen und eine Funktionalität zumindest unter Hypoxie nahe legen. Weiterhin wurde das Vorkommen *Spalax*-spezifischer HREs untersucht, die Hinweise auf höhere konstitutive Expressionslevel in der Blindmaus geben könnten. Dies setzt jedoch voraus, dass, wie auch in der Niere (Shams et al. 2004), HIF-1 im Gehirn konstitutiv schon unter normoxischen Bedingungen höher exprimiert würde. Wie oben schon beschrieben, hat ein wiederholt durchgeführter Western-Blot mit einem gegen Hif-1 gerichteten Antikörper nicht funktioniert und bedarf einer Wiederholung.

Die Genexpressionsdaten nach Hypoxie zeigen, dass *Cygb* im Gehirn nur leicht, in der Leber und im Herzen stärker hochreguliert werden (vgl. Abbildung 3-14), was höchstwahrscheinlich durch das Vorhandensein der beschriebenen HREs im *Cygb*-Gen gewährleistet wird. Vor allem die beiden im Promotor/Exon 1 beider Spezies vorkommenden HREs könnten dafür verantwortlich sein, eine Hypoxieantwort des *Cygb*-Gens zu induzieren. Eine Regulation von *Cygb* unter Hypoxie ist also wahrscheinlich durch Hif-1 vermittelt. Dies konnte auch kürzlich von einer Arbeitsgruppe funktionell gezeigt werden (Guo et al. 2007), die mittels *Gel Shift*- und *Chromatin Immunoprecipitation-Assays* den Nachweis erbracht hat, dass das menschliche HIF-1-Protein an die HREs im Cytoglobingen binden.

Um die verbesserte Überlebensfähigkeit unter Sauerstoffmangel von *Spalax* gegenüber der Ratte zu erklären, wurden in Abbildung 4-6 A auch die *Spalax* spezifischen HREs untersucht. Im Promotorbereich hat *Spalax*, verglichen mit der Ratte, keine zusätzlichen Hypoxie-responsiven Elemente, jedoch eine große Anzahl potenzieller HREs in Intron 1, Exon 2 und Exon 3. Die Gesamtzahl der HREs, die in *Spalax* vorkommen, beträgt zwölf, in Ratte lediglich die Hälfte. Das kann dafür sprechen, dass unter Hypoxie *Spalax* das Cytoglobin stärker anschaltet, was auch experimentell nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.1.2.3). Eine Beschreibung, dass die unterschiedliche HRE-Anzahl in orthologen Genen für die Stärke der

DISKUSSION

Hochregulation verantwortlich sein könnte, wurde in der Literatur jedoch noch nicht beschrieben. Diese Aussage bedarf einer zusätzlichen experimentellen Überprüfung mittels Promotor-Assays.

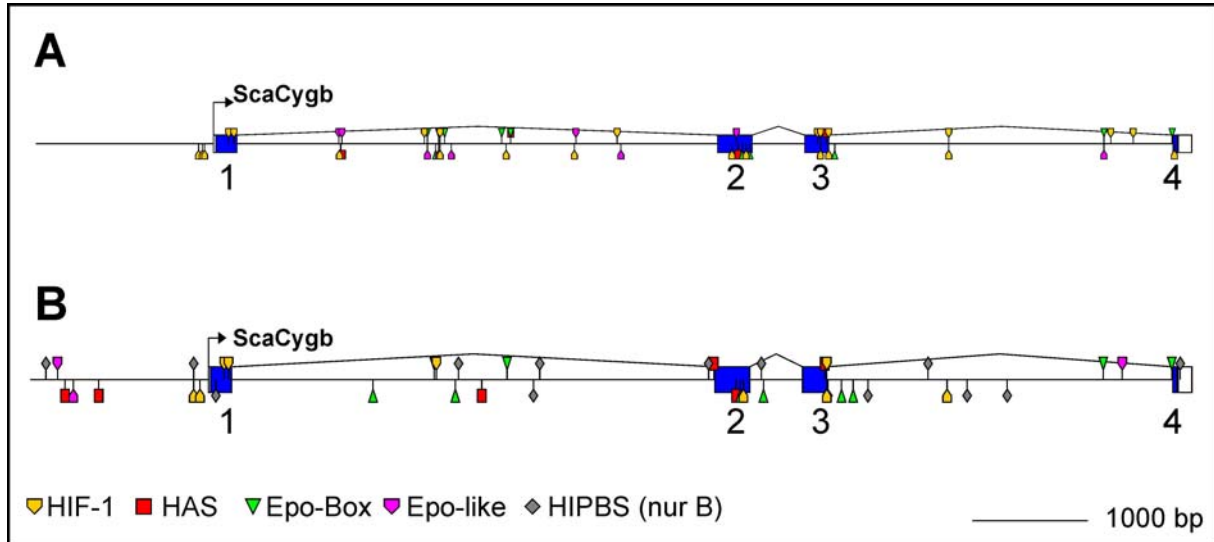


Abbildung 4-6: (A) Abbildung der in *Spalax* vorkommenden Hypoxia responsive elements (HREs) des Cytoglobins aus *S. carmeli* ($2n=58$). Voraussetzung für ein HRE ist das Vorkommen einer Hif-1 Bindestelle mit einem in der Entfernung von maximal 50 Bp liegenden, ergänzenden Sequenzmotiv (Has: Hif ancillary sequence). (B) Hif-1- und ergänzende Bindestellen, die zwischen *Spalax* und Ratte konserviert vorliegen. Diese Bindemotivkonservierung ist ein Zeichen für ihre funktionelle Relevanz (Wystub et al. 2004).

Cygb besitzt auch einige HIPBS-Elemente, die dafür Sorge tragen, dass Gene, die durch Hypoxie reguliert werden, auf mRNA-Ebene stabilisiert werden (Czyzyk-Krzeska und Beresh 1996; Scandurro und Beckman 1998). Das führt letztlich durch die längere Lebenszeit der mRNA zu einer verstärkten Verfügbarkeit und einer Hochregulation des entsprechenden Gens bei Hypoxie. Eine höhere Anzahl an HIPBS-Motiven wurde bei der vergleichenden Untersuchung des Cytoglobins in *Spalax* vs. Ratte nicht gefunden.

4.2.4 Die möglichen Funktionen des Cytoglobins

Auch das Cytoglobin (Cygb) ist potenziell dazu in der Lage, unterschiedlichste Funktionen auszuführen, die im Nachfolgenden diskutiert werden.

4.2.4.1 Cygb: Lieferant von Sauerstoff an Enzyme?

Im Herz und der Leber exprimieren v. a. Fibroblasten oder deren verwandte Zellen Cytoglobin. Fibroblasten sind zudem die Orte der Kollagenbildung. Die Enzyme, die die

DISKUSSION

einzelnen Kollagenketten zu einer Triple-Helix verbinden, sind die Prolyl-Hydroxylasen, die Hydroxylgruppen an Prolinreste der Kollagene anhängen (Myllyharju 2003). Zu dieser Reaktion wird Sauerstoff benötigt. Cytoglobin könnte also Lieferant von O₂ für die Prolyl-Hydroxylasen sein.

Prolyl-Hydroxylasen selbst dienen nicht nur der Hydroxylierung von Kollagen, sondern bestimmte Isoformen sind auch in die sauerstoffabhängige HIF-1 Signalkaskade eingebunden (vgl. 1.3.5.6). HIF-1 α , als die hypoxieinduzierte Untereinheit, wird durch die O₂-abhängige Hydroxylierung zweier Prolylreste reguliert (Semenza 2007). Hydroxyliertes HIF-1 α bindet dann an das von Hippel-Lindau-Protein (VHL), wodurch HIF-1 ubiquitiniert und mittels Proteosomen degradiert wird. Unter Sauerstoffmangel findet keine Hydroxylierung mehr statt, sodass HIF-1 nicht abgebaut wird und somit nach Translokation in den Kern als Transkriptionsfaktor Zielgene steuern kann. Wie die Untersuchung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen zeigt (vgl. 4.2.3), ist auch Cytoglobin wahrscheinlich ein Zielgen von HIF-1. Unter Sauerstoffmangel wird die Expression von Cygb angeschaltet. Dadurch gelangt mehr Sauerstoff zu den Prolyl-Hydroxylasen. Die Hydroxylierung kann wieder stattfinden, was zu einem geringeren Vorkommen von HIF-1 führt, als es ohne Hochregulation des Cygb der Fall wäre. Es könnte sich dabei um einen Regulationsmechanismus handeln, der dafür sorgt, dass die HIF-vermittelte Antwort ein wenig „gebremst“ wird. Nimmt man diese sehr hypothetische Funktion für Cygb an, so würde es auch Sinn machen, dass *Spalax* im Gegensatz zur Ratte unter milder Hypoxie bei 10 % O₂ Cygb hochreguliert, um die HIF-Antwort zu verlangsamen, da der gesamte Organismus sich schon an die erniedrigten O₂-Bedingungen gewöhnt hat. Zu dieser Hypothese würde passen, dass unter strenger Hypoxie von 6 % für 5 h Cygb nicht verstärkt bzw. in dem Gehirn der Ratte sogar vermindert exprimiert wird (unvereinbare Ausnahme: *S. judaei* (2n=60) nach kurzer starker Hypoxie).

Vorstellbar ist eine Funktion von Cygb entweder als Transporter oder als einfacher Sauerstoffspeicher, der die Diffusion hin zu den Orten des Verbrauchs erleichtern könnte. Auch andere Enzyme könnten von Cytoglobin mit Sauerstoff versorgt werden, wie z. B. die NO-Synthasen, die aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff unter Entstehung von L-Citrullin NO synthetisieren können (Leone et al. 1991). NO ist als Radikal nicht unter allen Umständen schädlich für die Zelle, sondern es dient auch als vielfältiges Signalmolekül, z. B. bei neuronaler Signalvermittlung, bei der Entzündungsantwort, bei der Regulierung von Ionenkanälen, bei phagozytotischen Abwehrmechanismen, bei kardiovaskulärer Homöostase (Moncada et al. 1988; Moncada et al. 1988; Snyder und Bredt 1992; Ignarro 2002; Gong et al.

2004; Tuteja et al. 2004) oder der Vasodilatation bei Entzündungsreaktionen (Wang et al. 1996).

4.2.4.2 Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies und weitere Funktionen

Eine weitere Funktion von Cygb kann die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies sein. Hinweise darauf geben die Untersuchungen von Dreidax (2006), die zeigen, dass unter Hyperoxie bzw. ROS-Entstehung Cygb in Lunge, Herz und Gehirn hochreguliert wird. Ausstehende Untersuchungen sollen zeigen, dass auch in *Spalax* unter Hyperoxie reaktive Sauerstoffradikale entstehen.

Über eine Funktion als NO-Dioxygenase, O₂-Sensor oder auch terminale Oxidase kann nur spekuliert werden, da hierzu bislang keine Daten vorliegen. Weitere Untersuchungen z. B. mit funktionellen Zellkulturassays müssen angestellt werden, um mehr Hinweise auf die Aktivität oder Funktion von Cygb zu bekommen.

4.2.5 Cytoglobin in der Retina – keine klaren Hinweise auf eine bestimmte Funktion

Cytoglobin wurde fast ausschließlich im Zytoplasma der neuronalen Zellen der Ganglienzellschicht der *Spalax*-Retina gefunden (Abbildung 3-25). Leicht gefärbt war auch die innere plexiforme Schicht. Da das *Spalax*-Auge nur Helligkeitsunterschiede wahrnehmen kann und subkutan lokalisiert ist, hat es die Sehfähigkeit verloren und besitzt auch keine Linse mehr. Das Fehlen der Linse bedingt auch das Fehlen des Ciliarkörpers in *Spalax*, dessen Fibroblasten in der Maus Cytoglobin exprimieren. Ein weiterer Unterschied, der auf die Blindheit von *Spalax* zurückzuführen ist, ist das Fehlen von Cygb-Färbung in der inneren nukleären Schicht, die bei der Maus starke Expression zeigt. Im Auge und im Gehirn sind nicht alle neuronalen Zellen angefärbt. In der Ganglienzellschicht konnte eine nukleäre sowie zytoplasmatische Cygb-Lokalisierung gefunden werden, was dem subzellulären Expressionsmuster der Neurone im Gehirn entspricht. Neben der Cygb-Lokalisierung wurde auch die Lokalisierung der neuronalen NO-Synthase untersucht. Bei der Maus ist hingegen eine ähnliche Funktion von Cygb im Auge und im Gehirn zu erwarten (Wystub 2007). Zumindest dort konnte eine überwiegende Kolo-kalisation von Cygb mit der neuronalen NO-Synthase (nNOS) gefunden werden, was die Vermutung nahe legt, dass Cygb am NO-Stoffwechsel beteiligt ist. Dabei könnte Cygb den von der nNOS benötigten Sauerstoff bereitstellen.

4.3 Das Myoglobin in Spalax - Bestätigung alter Ergebnisse und neue Erkenntnisse

Das Myoglobin in *Spalax* wurde in dieser Arbeit nicht zum ersten Mal untersucht, sondern es gab schon Untersuchungen seiner Expression im Skelett- und Herzmuskel (Widmer et al. 1997). Dabei konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass *Spalax* im Skelettmuskel mehr Myoglobin exprimiert als die Ratte, was auf eine verbesserte Sauerstoffversorgung hindeutet. Die von uns erhaltenen mRNA-Daten sind mit diesen Untersuchungen sehr gut übereinzubringen. Auch auf mRNA-Ebene konnte im *Spalax* Skelettmuskel eine höhere normoxische Expression gefunden werden, wenngleich in einem sehr viel größeren Ausmaß. Die Expression in *Spalax* unter Hypoxie entspricht nicht den für andere hypoxietolerante Säuger bekannten Tendenzen. *Spalax* reguliert zumindest die Mb-mRNA zum Teil sehr stark herunter. Das widerspricht der Tendenz, Sauerstoffspeicherproteine unter Hypoxie hochzuregulieren, um eine höhere Sauerstoffkapazität im Muskel zu haben (Hochachka et al. 1983). Die Herunterregulation passt jedoch zur Energiesparhypothese unter Hypoxie (Hypometabolismus; Ramirez et al. 2006), die besagt, dass Sauerstoff im Muskel eingespart wird.

Auch im Herzen beider *Spalax*-Spezies wird Mb nach unseren Untersuchungen zumindest auf mRNA-Level in höherem Maße exprimiert als in der Ratte. Das passt dazu, dass Sauerstoff im Herzen, dem neben dem Gehirn sauerstoffsensitivsten Organ, im Notfall schnell bereitgestellt werden könnte. Ebenso wie das Gehirn, ist auch der Herzmuskel nicht in der Lage, auf anaeroben Metabolismus umzuschalten. Es könnte sich also um eine Präadaptation an Hypoxie in *Spalax* handeln, der dafür Sorge trägt, immer genügend Sauerstoff zur Verfügung zu haben. Auf Proteinebene jedoch wurde von Widmer et al. (1997) gezeigt, dass es wohl keine höheren Mb-Level in *Spalax* vs. Ratte gibt, weshalb es fraglich bleibt, ob eine Präadaptation im Herzen an Sauerstoffmangel tatsächlich gegeben ist.

Unter Hypoxie reagiert das Herz bei weitem nicht so stark wie der Skelettmuskel. Es kommt außer bei *S. judaei* (2n=60) in allen untersuchten Tieren und Hypoxiedauern zu einer leicht verstärkten Expression (< Faktor 2), was darauf hindeutet, dass beim Herzmuskel keine Sauerstoffunterversorgung stattfinden darf, da diese für das Tier tödlich wäre.

4.4 Operationsmethoden in tiefer Hypothermie bei schweren angeborenen Herzfehlern – Hinweise auf Verbesserung der Sauerstoffverfügbarkeit?

Um weitere Hinweise auf die Funktionen von Ngb und Cygb zu erhalten, wurde mit dem Schwein (*Sus scrofa*) ein etwas unkonventioneller Modellorganismus untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde das Schwein aus zwei Gründen verwendet. Zum einen diente es neben der Ratte als weiterer hypoxiesensitiver Modellorganismus, in dem die Expression von Ngb und Cygb nach einer besonderen Art von Hypoxie mit anschließender Reperfusion untersucht wurde. Zum anderen hat die Arbeitsgruppe um PD Dr. Abdul-Khaliq (Deutsches Herzzentrum, Berlin) ein neonatales Schweinemodell entwickelt, an welchem neuroprotektive Strategien bei Säuglingen nach DHCA getestet werden sollten (Abdul-Khaliq et al. 2001). Dabei stellte sich die Frage, ob Medikamente, wie das Steroidhormon Methylprednisolon (MP) oder das Immunsuppressivum FK506, selbst neuroprotektiv wirkt oder die Bildung neuroprotektiver Proteine (vielleicht Ngb oder Cygb) anregt. Aus den mit und ohne Medikamenten behandelten Schweinen wurden Gehirne isoliert und in der vorliegenden Arbeit auf ihre Expression von Neuroglobin und Cytoglobin hin untersucht, um eine mögliche Rolle bei der Neuroprotektion aufzudecken.

4.4.1 Ngb in Ferkeln nach tiefer Hypothermie – Hinweise auf Sauerstoffversorgungsfunktion oder auch Neuroprotektion?

Die Untersuchungen des Neuroglobins nach 60 bzw. 120 minütiger tiefer Hypothermie (DHCA 60 und 120) sprechen für eine Funktion des Neuroglobins als intrazellulärer Sauerstoffspeicher oder als Protein, das ROS entgiftet. Die Regulation aufgrund geringer Hypoxie, wie sie nach 60 bzw. 120 minütiger DHCA in Verbindung mit extrakorporaler Zirkulation auftritt, entspricht in etwa dem Expressionsverhalten der hypoxiesensitiven Ratte und den beiden hypoxietoleranten *Spalax*-Spezies. Es kommt, zumindest wenn das Gewebe geschädigt wird, zu einer Herunterregulation von Ngb. Die unter 4.1.4 beschriebenen Funktionen scheinen also auch auf Ngb im Schwein zuzutreffen.

Betrachten wir nun das Schwein als Modellsystem für die Operation am Herzen von Säuglingen, um herauszufinden, ob der durch das Steroidhormon Methylprednisolon (MP) und das Immunsuppressivum FK506 vermittelte protektive Effekt im Gehirn auf Ngb zurückzuführen sein kann. Die Expressionsdaten, die nach Gabe von MP erhalten wurden, deuten nicht auf eine Protektivität hin. Wäre Ngb protektiv, bzw. würde die Protektivität, die

DISKUSSION

von intrathekaler Verabreichung von Methylprednisolon (MP-T) gefördert wird, auf Ngb zurückzuführen sein, so sollte es eine verstärkte Expression von Ngb auf mindestens den gleichen Level des Normalzustandes ohne Kreislaufstillstand geben. Jedoch lag der Ngb-Level im Gehirn bei MP-T ebenso niedrig wie bei nicht-medikamentös behandelten Tieren oder bei Tieren, denen MP systemisch verabreicht wurde, wo es zu keinem protektiven Effekt kam. Das Immunsuppressivum FK506 ist in der Lage, Protektivität im Gehirn nach DHCA für 120 min hervorzurufen. Auch Ngb wurde durch die Gabe von FK506 heraufreguliert, wobei unklar ist, ob es eine Verbindung zwischen Ngb und Protektivität gibt. Diese potenzielle Schutzfunktion von Ngb in Neuronen passt zu Daten, die an Zellkulturen durchgeführt wurden (Sun et al. 2001). FK506 gehört zur Gruppe der Makroliden, die Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität blockieren. Es bildet mit dem Immunophilin FKBP12 einen Komplex, der Calcineurin inhibiert und somit den T-Lymphocyten Signalweg sowie die IL-2 Transkription hemmt. Bei den oben angestellten Hypothesen muss man berücksichtigen, dass die Genexpressionsuntersuchungen nicht auf Proteinebene erfolgten, sondern auf mRNA-Ebene.

4.4.2 Cytoglobin beim Schwein: Keine neuen Funktionshinweise

Die Expression von Cygb im hypoxiesensitiven Schwein entspricht nur teilweise den Ergebnissen, die bei der ebenfalls hypoxiesensitiven Ratte erhalten wurden. Die Ratte reguliert das Cygb unter Hypoxie im Gehirn nicht hoch, *Spalax* hingegen nur leicht um maximal Faktor 2. In *Spalax* ist auch ein Anstieg der mRNA mit der Dauer der Hypoxie zu verzeichnen. Das Schwein hingegen zeigt bei DHCA 60 einen Anstieg der Cygb Expression, die bei 120 min DHCA wieder auf den Wert der Referenzprobe ohne DHCA abfällt. Dieser „wellenförmige Verlauf“ ist mit einer Sauerstoffspeicherfunktion nur schwer in Einklang zu bringen. Die für Cytoglobin propagierte Funktion eines Proteins, das O₂ für Enzymreaktionen anliefert, passt zu den erhaltenen Ergebnissen; um welche Enzymreaktion es sich genau handelt, konnte hierbei nicht weiter bestimmt werden. Auch die Auswirkung, die die Gabe von Steroiden oder Immunsuppressivum auf die Cygb-Expression hat, scheint keine einfache, wenig spekulative Antwort auf die Frage nach der Funktion von Cygb im Operationsmodell für angeborene Kinderkrankheiten geben zu können.

4.5 Normalisierung auf cDNA-Ebene: Methode zur Normalisierung von quantitativen Realtime RT-PCR-Daten auf Ebene der cDNA?

Die Normalisierung von Daten, die mit Hilfe der quantitativen Realtime RT-PCR generiert werden, ist einer der wichtigsten Schritte überhaupt, um zuverlässige Aussagen über die Genexpression bestimmter Gene machen zu können. Die Verlässlichkeit eines Experiments nimmt mit der Einführung invarianter endogener Kontrollen zu, wodurch Unterschiede von Probe zu Probe korrigiert werden können (Bustin 2004). Zur Normalisierung von Genexpressionsdaten war es bis vor einigen Jahren weit verbreitet, die Expression eines zu untersuchenden Gens auf die Expression eines einzelnen sog. Haushaltgens zu beziehen, d.h. darauf zu normalisieren (Spanakis 1993, Bustin et al. 2005). Auch heute werden in vielen Publikationen solche Gene zur Datennormalisierung verwendet, von denen man weiß, dass sie mehr oder weniger in allen Geweben exprimiert werden, wie z. B. Gapdh. Gleichzeitig wird oftmals auch ohne eigene Experimente oder Hinweise aus der Literatur angenommen, dass die Genexpression auf gleichem Level stattfindet. Diese stabile Expression ist für eine Normalisierung jedoch unbedingt erforderlich. Da die Bezeichnung Haushaltgen in diesem Zusammenhang irreführend ist, führte man den Begriff „Referenzgen“ ein, der besagt, dass ein Gen in dem untersuchten Gewebe stabil exprimiert sein muss. Damit ein Gen als Referenzgen verwendet werden kann, muss zuerst bewiesen werden, dass dieses Gen unter den untersuchten Bedingungen auch tatsächlich stabil exprimiert wird. Dies geschieht am einfachsten ebenfalls durch qRT-PCR-Versuche. Die Qualität der normalisierten Daten hängt stark von der Stabilität des Gens ab, auf das normalisiert werden soll. Ein weiterer Schritt zu verlässlicheren Daten durch akkuratere Normalisierung ist die Einbeziehung mehrerer Referenzgene in die Expressionsberechnung Vandesompele et al. (2002). Es sollte darauf geachtet werden, dass die verschiedenen zu Hilfe genommenen Referenzgene nicht aus dem selben Stoffwechselweg stammen, was dazu führen kann, dass die Gene unter den untersuchten Bedingungen gleichartig reguliert werden und somit das Ergebnis verfälschen können.

Um das Problem mit regulierten Referenzgenen zu umgehen, ist es ebenfalls anerkannt, keine Normalisierung mit solchen Genen durchzuführen, sondern sich auf die akkurate Quantifizierung der RNA mit Hilfe der optischen Dichte Messung zu beschränken. Diese Methode ist weitaus zuverlässiger als die Verwendung eines einzelnen, womöglich regulierten Referenzgenes Bustin (2000, 2002) und wurde auch in der vorliegenden Arbeit oftmals verwendet. Hierbei normalisiert man vorwiegend auf rRNA, die in einer isolierten Gesamt-

DISKUSSION

RNA ca. 95 % ausmachen. Auch diese Methode ist sicherlich nicht frei von Fehlern, da es bis heute nur wenige Untersuchungen darüber gibt, wie sich das mRNA zu rRNA-Verhältnis unter bestimmten Bedingungen ändert und ob es auf Grund von Hypoxie zu veränderten Halbwertszeiten von mRNA oder rRNA kommt (Paulding und Czyzyk-Krzeska 2000). Ein zusätzliches Problem, welches durch Verwendung von Referenzgenen teilweise umgangen wird, ist, dass die Effizienz der reversen Transkription sehr variabel sein kann. Dies war der Anlass, eine neue Methode zu entwickeln, mit der man die oben beschriebenen Probleme lösen kann. Diese Methode sollte also so ausgewählt sein, dass die unterschiedlichen Effizienzen der reversen Transkriptionsreaktionen mit einbezogen werden und das Problem der Normalisierung auf einzelne Referenzgene umgeht. Diese Voraussetzungen legen eine Normalisierung der Daten auf cDNA-Ebene nahe. Man müsste keine Referenzgene benutzen, wenn man genau wüsste, wie viele Matrizenmoleküle in jeder einzelnen PCR-Reaktion eingesetzt wurden, was sehr viel Zeit und Kosten sparen würde. Das sich potenziell unter bestimmten Bedingungen variierende Verhältnis von mRNA zu rRNA, wäre bei dieser neuartigen Normalisierungsmethode vernachlässigbar, wenn man mit der Messung der cDNA tatsächlich nur revers transkribierte Moleküle und keine rRNAs messen würde. Zwei Voraussetzungen hierfür sind, dass zum einen die eingesetzte Nachweismethode ausschließlich DNA-RNA-Hybride misst und zum anderen, dass die reverse Transkriptase unter Verwendung eines oligo-dT Primers tatsächlich nur mRNA-Moleküle umschreibt. Zum Messen der cDNA-Konzentration kam der Fluoreszenzfarbstoff *PicoGreen* (Invitrogen) zum Einsatz, der sich nach Angaben des Herstellers in die kleine Grube doppelsträngiger DNA-Moleküle sowie von DNA-RNA-Hybriden einlagert und dann erst fluoresziert, nicht jedoch in rückgefaltete RNA. Da durch DNase-Verdau während der RNA-Präparation die genomische DNA entfernt wurde, war davon auszugehen, dass bei Messung der Proben mit *PicoGreen* keine DNA vorlag. Wie die durchgeführten Versuche mit der *No-RT Kontrolle* und der *No-Template Kontrolle* zeigten, gab es in der Lösung doch Moleküle, an die sich der Fluoreszenzfarbstoff anlagerte. Man konnte erwarten, dass nach Fällung der cDNA die *No-RT Kontrolle* und die *No-Template Kontrolle* kein *PicoGreen* einlagern. Dies war jedoch nicht der Fall. Die 1 µg-*No-RT-Probe* zeigt einen Wert, der auf gleichem Niveau wie die 500 ng revers transkribierte Probe liegt. Diese Fluoreszenz wird höchstwahrscheinlich durch die in Lösung vorhandene RNA zustande gekommen sein, da die nach reverser Transkription vorhandenen ungebundenen oligo-dT Primer aus der Lösung herausgefällt wurden. Ein kleiner Prozentsatz der im Überschuss zugesetzten Primer hat in der *No-RT-Kontrolle* vermutlich auch an RNA gebunden und wurde somit nicht aus der Lösung herausgefällt.

DISKUSSION

Diese Primer haben wahrscheinlich ebenfalls zur beobachteten Fluoreszenz beigetragen, alleine dafür verantwortlich waren sie aber sicherlich nicht. Vergleicht man die 1 μg -*no-RT-Probe* mit der 1 μg -*Gesamt-RNA-Probe*, so entsteht die Hälfte der Fluoreszenz der 1 μg -*Gesamt-RNA-Probe* möglicherweise durch RNA oder durch gebundene, aber nicht durch Fällung entfernte Primer. Nichtsdestoweniger ist eine Linearität der *PicoGreen* Messung vorhanden, entsprechend der zur reversen Transkription eingesetzten Gesamt-RNA-Menge.

Es wurde nach cDNA-Synthese auch die Genregulation mit Hilfe der quantitativen realtime-RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass es in diesem Fall keine Linearität zwischen stark unterschiedlich großen Mengen an revers transkribierter RNA gab. Kleine Unterschiede hingegen konnten durch die Methode in befriedigendem Maße detektiert werden (vgl. Tabelle 3-1). Die Methode ist also auch dazu in der Lage, leicht voneinander abweichende Mengen an revers transkribierter RNA zu unterscheiden, wie es auch bei Proben vorkommt, die aufgrund verschiedener Herkunft (individuelle Unterschiede, Gewebevergleiche, verschiedene Behandlungsmethoden der Proben) mit verschiedenen Effizienzen revers transkribiert werden.

Aufgrund der beschriebenen Probleme konnte die hier untersuchte Methode in der vorliegenden Arbeit (noch) nicht zur Normalisierung der Genexpression eingesetzt werden. Sie ist aber dann von großem Vorteil, sobald ein Farbstoff gefunden bzw. vertrieben wird, der zuverlässig an DNA-RNA-Hybride bindet. Weiterhin muss die Methode dahingehend verbessert werden, dass bei der reversen Transkriptionsreaktion vorhandene Oligonukleotide zuverlässig entfernt werden können. Die vorhandenen Daten sind also ein erster Schritt in die Richtung einer zuverlässigen Normalisierung von quantitativen Genexpressionsdaten.

5 Zusammenfassung

Hypoxie ist ein Zustand des Sauerstoffmangels, hervorgerufen durch fehlende Verfügbarkeit von Sauerstoff in der Umgebung eines Organismus oder durch pathologisch bedingte unzureichende Nutzbarkeit des Sauerstoffs von Geweben. Die Sensitivität gegenüber Hypoxie variiert enorm im Tierreich zwischen verschiedenen Phyla und Spezies. Die meisten Säugetiere sind nur unzureichend an niedrige Sauerstoffkonzentrationen angepasst, wohingegen einige unterirdisch lebende Säuger sehr resistent gegen Hypoxiestress sind. Um die molekulare Basis der Hypoxietoleranz zu bestimmen, wurden in der vorliegenden Arbeit Globine untersucht, die potenziell in der Lage sind, als respiratorische Proteine zur Hypoxietoleranz von Tieren beizutragen. Dazu wurde die Expression der Globine in der hypoxieresistenten, in Israel lebenden Blindmaus *Spalax ehrenbergi* mit der Genexpression in der hypoxiesensitiven Ratte (*Rattus norvegicus*) verglichen. In der vorliegenden Arbeit wurden die erst vor wenigen Jahren entdeckten Globine Neuroglobin und Cytoglobin untersucht, deren exakte physiologische Rolle noch unklar ist, und mit Daten des viel detaillierter untersuchten Myoglobins verglichen.

Beim Vergleich der Expression von Cytoglobin und Neuroglobin in *Spalax* versus Ratte fällt auf, dass Neuroglobin und Cytoglobin bereits unter normoxischen Bedingungen auf mRNA- und Proteinebene in der Blindmaus um einen Faktor von mindesten 2 bis 3 verstärkt exprimiert werden. Bei Myoglobin (als dem Kontrollgen mit bekannter Funktion) konnte auf mRNA-Ebene eine noch weitaus stärkere Expression in *Spalax* vs. Ratte gefunden werden. Das übergreifende Phänomen der verstärkten Genexpression von Globinen in *Spalax* kann im Sinne einer Präadaptation an das unterirdische, häufig hypoxische Leben der Blindmaus interpretiert werden. Einen weiteren Hinweis auf eine besondere, spezialisierte Funktion von Neuroglobin in *Spalax* geben immunhistochemische Daten, die zeigen, dass Neuroglobin im Gehirn von *Spalax* im Gegensatz zur Ratte nicht nur in Neuronen, sondern auch in Gliazellen exprimiert wird. Dies impliziert Änderungen des oxidativen Stoffwechsels im Nervensystem der hypoxietoleranten Spezies. Die zellulären Expressionsmuster von Cytoglobin erscheinen hingegen in beiden Säugerspezies weitgehend identisch.

Es wurde der Frage nachgegangen, ob und wie experimentell induzierte Hypoxie die Genexpression der Globine verändert. Dabei zeigten sich für Neuroglobin und Cytoglobin unterschiedliche Expressionsmuster. Neuroglobin wird unter diversen

ZUSAMMENFASSUNG

Sauerstoffmangelbedingungen sowohl in der Ratte als auch in *Spalax* auf mRNA- und Proteinebene herunterreguliert. Ein ähnliches Regulationsverhalten wurde auch für Myoglobin beobachtet. Die verminderte Expression von Neuroglobin (und evtl. auch Myoglobin) unter Hypoxie ist mit einer gezielten Verringerung der Sauerstoffspeicherkapazität in Abwesenheit von O₂ zu erklären. Ein weiterer denkbarer Grund könnte auch die allgemeine Tendenz sein, unter Hypoxie aus Energiespargründen den Metabolismus herunter zu regulieren.

Cytoglobin, das bei normalen Sauerstoffbedingungen nur im Gehirn von *Spalax* (nicht jedoch in Herz und Leber) ebenfalls um Faktor 2 bis 3 stärker exprimiert wird als in der Ratte, ist mit einiger Sicherheit ebenfalls von adaptivem Nutzen für die Anpassung von *Spalax* an niedrige Sauerstoffbedingungen, wenngleich seine Funktion unklar bleibt. Unter Hypoxie wird die Cytoglobin-mRNA sowohl in *Spalax* als auch in der Ratte hochreguliert. Es konnte in der vorliegenden Arbeit dargelegt werden, dass die Expression von Cygb höchstwahrscheinlich durch den Transkriptionsfaktor Hif-1 gesteuert wird, der die molekulare Hypoxieantwort vieler Tierarten zentral steuert.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Expression von Ngb und Cygb im Gehirn des Hausschweins (*Sus scrofa*) untersucht. Diese Spezies diente in der Arbeit als weiterer hypoxiesensitiver Organismus sowie als biomedizinisch relevantes Modell für eine Operation an Säuglingen mit angeborenen Herzkrankheiten. Die Versuche haben gezeigt, dass die Gabe bestimmter Medikamente wie dem Immunsuppressivum FK506 zu einer erhöhten Ngb-Konzentration auf mRNA-Ebene führen kann, was potenziell im Zusammenhang mit beobachteten protektiven Effekten der Medikamentengabe während und nach der Herzoperation steht.

6 Ausblick

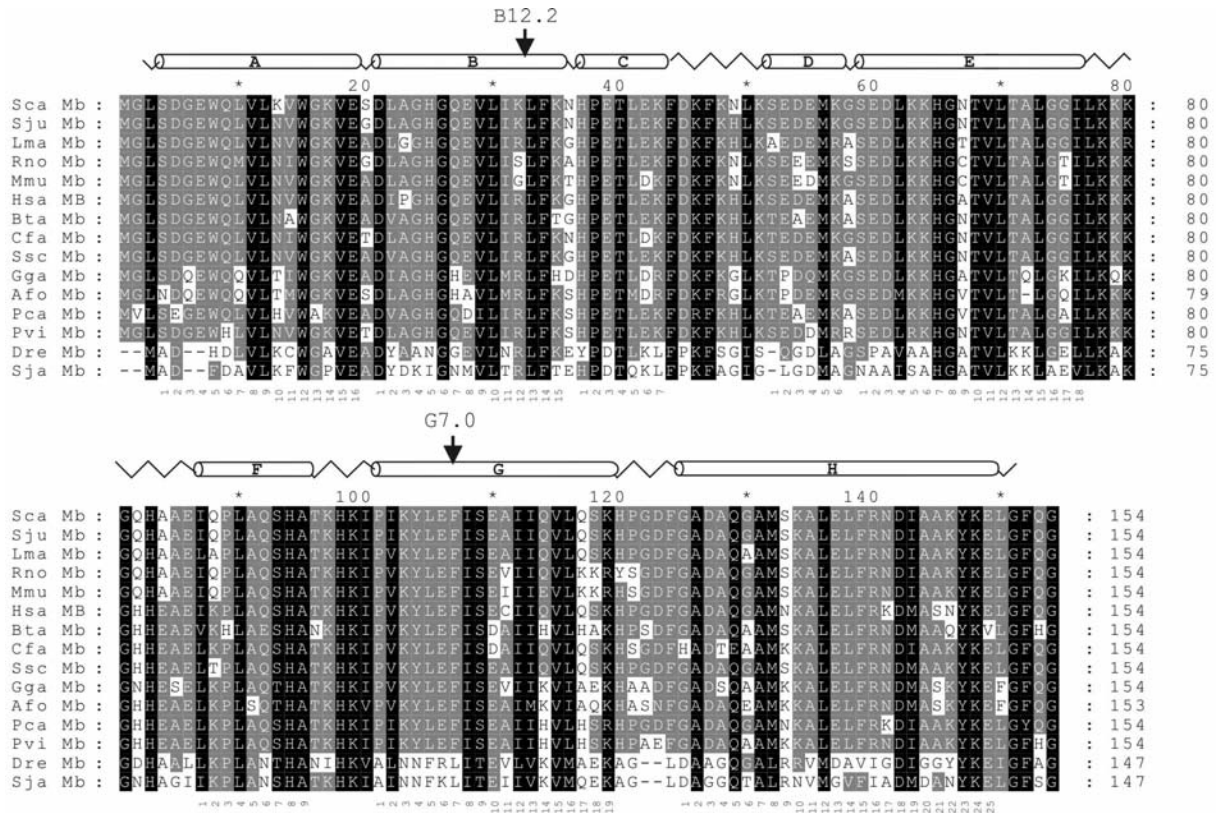
Im Anschluss an diese Arbeit stellen sich eine Reihe weiterer Versuche zur Genexpression der untersuchten Globine.

- Es kann untersucht werden, ob es im Gehirn, wie in der Niere auch, tatsächlich höhere Hif-1 Level gibt, die möglicherweise ursächlich für die erhöhte Neuroglobinexpression verantwortlich sind. Dazu muss der in dieser Arbeit mehrfach vergeblich durchgeführte Western Blot-Nachweis mit weiteren Antikörpern gegen Hif-1 versucht werden.
- Weitere Hinweise auf die Grundlagen der verstärkte Expression der Globine in *Spalax* können *Luziferase-Promoter-Assays* geben. Sie sollen zeigen, ob und welche Promotorbereiche in *Spalax* aktiver sind als in der Ratte und ob die Promotoren tatsächlich durch Hif-1 gesteuert werden.
- Es müssen sowohl für Ngb als auch für Cygb mehr funktionelle Untersuchungen gemacht werden. Zum einen können dazu Zellkultursysteme verwendet werden, zum anderen sollten knock-out oder knock-down Experimente zeigen, wie sich Organismen zum Beispiel unter Hypoxie beim Fehlen von Ngb und Cygb verhalten. Auch transgene Tiere, die Ngb und Cygb verstärkt exprimieren, könnten klären, ob die Gene direkt die Sauerstoffverfügbarkeit des Gehirns oder anderer Gewebe involviert sind und somit die Überlebensfähigkeit unter Hypoxie fördern.

7 Anhang

7.1 Anhang 1: Aminosäurealignment der orthologen Myoglobine von Tieren verschiedener Vertebratengruppen, inklusive diverser Meeressäuger.

Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge: Afo: *Aptenodytes forsteri* (Kaiserpinguin); Bta: *Bos taurus*; Cfa: *Canis familiaris*; Dre: *Danio rerio*; Gga: *Gallus gallus*; Hsa: *Homo sapiens*; Lma: *Lagostomus maximus*; Mmu: *Mus musculus*; Pca: *Physeter catodon* (Pottwal); Ptr: *Pan troglodytes*; Pvi: *Phoca vitulina* (Seehund); Rno: *Rattus norvegicus*; Sca: *Spalax carmeli* (2n=58); Sga: *S. galili* (2n=52); Sja: *Scomber japonicus* (Mittelmeermakrele); Sgo: *S. golani* (2n=54); Sju: *Spalax judaei* (2n=60); Ssc: *Sus scrofa*.



ANHANG

7.2 Anhang 2: Sequenzalignment der kodierenden Bereiche des Neuroglobin-Gens. (Abk. siehe Anhang 1)

```

                *           20           *           40           *           60
Sga Ngb : ATGGAGCGCCAGAGCCGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGCACCGTGAGCCGCAACCCG : 60
Sgo Ngb : ATGGAGCGCCAGAGCCGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGCACCGTGAGCCGCAACCCG : 60
Sca Ngb : ATGGAGCGCCAGAGCCGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGCACCGTGAGCCGCAACCCG : 60
Sju Ngb : ATGGAGCGCCAGAGCCGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGCACCGTGAGCCGCAACCCG : 60
Rno Ngb : ATGGAGCGCCTAGAGTCAGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGGGCAGTGAGCCGCAACCCG : 60
Mmu Ngb : ATGGAGCGCCCGAGTCAGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGGGTAGTGAGCCGCAACCCG : 60
Bta Ngb : ATGGAGCTCCCGGAGCCGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGGGAGTGAGCCGCAACCCG : 60
Ssc Ngb : ATGGAGCGCCCGGAGCATGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGGGCGTGAGCCGCAACCCG : 60
Cfa Ngb : ATGGAGCGCCCGGAGCCGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGGGCGTGAGCCGCAACCCG : 60
Hsa NGB : ATGGAGCGCCCGGAGCCGAGCTGATCCGGCAGAGCTGGCGGGCAGTGAGCCGCAACCCG : 60
    
```

```

                *           80           *           100           *           120
Sga Ngb : CTGGAGCATGGCACTGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
Sgo Ngb : CTGGAGCATGGCACTGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
Sca Ngb : CTGGAGCATGGCACTGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
Sju Ngb : CTGGAGCATGGCACTGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
Rno Ngb : CTGGAACATGGCACTGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
Mmu Ngb : CTGGAACATGGCACTGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
Bta Ngb : CTGGAGCATGGCACCGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
Ssc Ngb : CTGGAGCACGGCACCGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
Cfa Ngb : CTGGAGCACGGCACCGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
Hsa NGB : CTGGAGCACGGCACCGTCTGTTCGCCAGACTCTTTGCCCTGGAGCCTAGCCTGCTGCC : 120
    
```

```

                *           140           *           160           *           180
Sga Ngb : CTTTTCCAGTACAGTGGCCGCCAGTTCTCCAGCCCTGAGGACTGTCTCTCCTCCCGGAA : 180
Sgo Ngb : CTTTTCCAGTACAGTGGCCGCCAGTTCTCCAGCCCTGAGGACTGTCTCTCCTCCCGGAA : 180
Sca Ngb : CTTTTCCAGTACAATGGCCGCCAGTTCTCCAGCCCTGAGGACTGTCTCTCCTCCCGGAA : 180
Sju Ngb : CTTTTCCAGTACAATGGCCGCCAGTTCTCCAGCCCTGAGGACTGTCTCTCCTCCCGGAA : 180
Rno Ngb : CTCTTCCAGTACAATGGCCGCCAGTTCTCCAGCCCTGAGGACTGTCTCTCCTCCAGAA : 180
Mmu Ngb : CTCTTCCAGTACAATGGCCGCCAGTTCTCCAGCCCTGAGGACTGTCTCTCCTCCAGAA : 180
Bta Ngb : CTCTTCCAGTACAATGCCGCCAGTTCTCCAGCCAGAGGACTGCCTGTCTTCCCGGAG : 180
Ssc Ngb : CTCTTCCAGTACAATGCCGCCAGTTCTCCAGCCGGAGGACTGCCTGTCTTCCCGGAG : 180
Cfa Ngb : CTCTTCCAGTACAATGCCGCCAGTTCTCCAGCCGGAGGACTGCCTGTCTTCCCGGAG : 180
Hsa NGB : CTCTTCCAGTACAATGCCGCCAGTTCTCCAGCCAGAGGACTGTCTCTCCTCCCTGAG : 180
    
```

```

                *           200           *           220           *           240
Sga Ngb : TTCCTGGATCACATAAGGAAGGTGATGCTCGGTGATTGATGCTGCAGTGACCAACGTGGAG : 240
Sgo Ngb : TTCCTGGATCACATAAGGAAGGTGATGCTCGGTGATTGATGCTGCAGTGACCAACGTGGAG : 240
Sca Ngb : TTCCTGGATCACATAAGGAAGGTGATGCTCGGTGATTGATGCTGCAGTGACCAACGTGGAG : 240
Sju Ngb : TTCCTGGATCACATAAGGAAGGTGATGCTCGGTGATTGATGCTGCAGTGACCAACGTGGAG : 240
Rno Ngb : TTCCTGGACCACATTAGGAAGGTTATGCTTGTGATTGATGCTGCTGTGACCAACGTAGAG : 240
Mmu Ngb : TTCCTGGACCACATTAGGAAGGTTATGCTTGTGATTGATGCTGCTGTGACCAACGTGGAG : 240
Bta Ngb : TTCCTGGACCACATCAGGAAGGTGATGCTCGGTGATTGATGCTGCGGTGACCAATGTGGAG : 240
Ssc Ngb : TTCCTGGACCACATCAGGAAGGTGATGCTTGTGATTGATGCTGCAAGTACTAACGTGGAG : 240
Cfa Ngb : TTCCTGGACCACATCAGGAAGGTGATGCTCGGTGATTGACACTGCTGTGACCAATGTAGAG : 240
Hsa NGB : TTCCTGGACCACATCAGGAAGGTGATGCTCGGTGATTGATGCTGCAAGTACTAACGTGAA : 240
    
```

ANHANG

Fortsetzung Anhang 2: Neuroglobin-Nukleotidalignment:

	*	260	*	280	*	300	
Sga Ngb :	GACTTGTCTCCTCACTGGAGGAGTACCTAGCCAGTTTGGGCAAGAAGCATCGGGCAGTGGGC						: 300
Sgo Ngb :	GACTTGTCTCCTCACTGGAGGAGTACCTAGCCAGTTTGGGCAAGAAGCATCGGGCAGTGGGC						: 300
Sca Ngb :	GACTTGTCTCCTCACTGGAGGAGTACCTAGCCAGTTTGGGCAAGAAGCATCGGGCAGTGGGC						: 300
Sju Ngb :	GACTTGTCTCCTCACTGGAGGAGTACCTAGCCAGTTTGGGCAAGAAGCATCGGGCAGTGGGC						: 300
Rno Ngb :	GACCTGTCTTTCACCTGGAGGAGTACCTGCCACCTTGGGCAGGAAGCATCGGGCAGTGGGA						: 300
Mmu Ngb :	GACCTGTCTTTCATTTGGAGGAGTACCTGACCAGCTTGGGCAGGAAGCATCGGGCAGTGGGA						: 300
Bta Ngb :	GACCTGTCTCCTCCCTGGAGGAGTACCTGCCCGCCTGGGCAGGAAGCATCGGGCAGTGGGC						: 300
Ssc Ngb :	GACCTGTCTCCTCGCTGGAGGAGTACCTTGCCGGCCTGGGCAGGAAGCATCGGGCAGTGGGT						: 300
Cfa Ngb :	GACCTGTCTCCTCGCTGGAGGAGTACCTTGCTGGCCTGGGCAGGAAGCATCGTGCAGTGGGT						: 300
Hsa NGB :	GACCTGTCTCCTCACTGGAGGAGTACCTTGCCAGCCTGGGCAGGAAGCATCGGGCAGTGGGT						: 300

	*	320	*	340	*	360	
Sga Ngb :	GTGAGGCTCAGCTCCTTCTCGACAGTGGGTGAGTCCCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360
Sgo Ngb :	GTGAGGCTCAGCTCCTTCTCGACAGTGGGTGAGTCCCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360
Sca Ngb :	GTGAGGCTCAGCTCCTTCTCGACAGTGGGTGAGTCCCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360
Sju Ngb :	GTGAGGCTCAGCTCCTTCTCGACAGTGGGTGAGTCCCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360
Rno Ngb :	GTGAGGCTCAGCTCCTTCTCGACAGTAGGTGAGTCCCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360
Mmu Ngb :	GTGAGGCTCAGCTCCTTCTCGACAGTAGGCGAGTCCCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360
Bta Ngb :	GTGAAGCTCAGCTCCTTCTCGACGGTGGGTGAGTCCCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360
Ssc Ngb :	GTGAAGCTCAGCTCCTTCTCGACGGTGGGTGAGTCCCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360
Cfa Ngb :	GTGAAGCTCAGCTCCTTCTCGACGGTGGGTGAGTCCCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360
Hsa NGB :	GTGAAGCTCAGCTCCTTCTCGACAGTGGGTGAGTCTCTGCTCTACATGCTGGAGAGGTGC						: 360

	*	380	*	400	*	420	
Sga Ngb :	CTGGGACCCGCTTTCACACCAGCCACAAGGGCCGCTGGAGCCAGCTCTACGGGGCTGTG						: 420
Sgo Ngb :	CTGGGACCCGCTTTCACACCAGCCACAAGGGCCGCTGGAGCCAGCTCTACGGGGCTGTG						: 420
Sca Ngb :	CTGGGACCCGCTTTCACACCAGCCACAAGGGCCGCTGGAGCCAGCTCTACGGGGCTGTG						: 420
Sju Ngb :	CTGGGACCCGCTTTCACACTTAGCCACAAGGGCCGCTGGAGCCAGCTCTACGGGGCTGTG						: 420
Rno Ngb :	CTGGGTCCCGACTTTACGCCGGCTTACAAGGACCGCCTGGAGCCACTCTACGGAGCTGTG						: 420
Mmu Ngb :	CTGGGTCCCGACTTTACACCAGCTTACAAGGACCGCCTGGAGCCAGCTCTACGGAGCTGTG						: 420
Bta Ngb :	CTGGGCCCTTGCCTTTCACACCAGCCACTTCGGGCTTGCCCTGGAGCCAGCTCTACGGGGCCGTG						: 420
Ssc Ngb :	CTCGGCCCCACCTTTCACACCAGCCACACCGGGCCGCTGGAGCCAGCTCTACGGGGCCGTG						: 420
Cfa Ngb :	CTGGGCCCCCGCTTTCACGCCAGCCGTGCGGGCCGCTGGAGCCAGCTCTACGGGGCCGTG						: 420
Hsa NGB :	CTGGGCCCTTGCCTTTCACACCAGCCACACCGGGCTTGCCCTGGAGCCACTCTACGGGGCCGTA						: 420

	*	440	*	
Sga Ngb :	GTGCAAGCCATGAGCCGAGGCTGGGATGGGGAGTAA			: 456
Sgo Ngb :	GTGCAAGCCATGAGCCGAGGCTGGGATGGGGAGTAA			: 456
Sca Ngb :	GTGCAAGCCATGAGCCGAGGCTGGGATGGGGAGTAA			: 456
Sju Ngb :	GTGCAAGCCATGAGCCGAGGCTGGGATGGGGAGTAA			: 456
Rno Ngb :	GTGCAAGCCATGAGCCGAGGCTGGGA			: 456
Mmu Ngb :	GTGCAAGCCATGAGCCGAGGCTGGGATGGGGAGTAA			: 456
Bta Ngb :	GTGCAGGCCATGAGTCGGGGCTGGGGTGGCCGAGTAA			: 456
Ssc Ngb :	GTACAGGCCATGAGTCGGGGCTGGGAATGGCCGAGTAA			: 456
Cfa Ngb :	GTGCAGGCCATGAGTCGAGGCTGGGACGGTGA			: 456
Hsa NGB :	GTGCAGGCCATGAGTCGAGGCTGGGATGGCCGAGTAA			: 456

ANHANG

7.3 Anhang 3: Sequenzalignment der kodierenden Bereiche des Cytoglobin- Gene aus ausgewählten Mammaliern. (Abk. siehe Anhang 1)

	*	20	*	40	*	60	
SgaCygb :	ATGGAGAAAGTGCCGGGCGAGATGGAGATCGAGCCGAGGGAGCGGAGCGAGGAGCTGTCC						: 60
SgoCygb :	ATGGAGAAAGTGCCGGGCGAGATGGAGATCGAGCCGAGGGAGCGGAGCGAGGAGCTGTCC						: 60
ScaCygb :	ATGGAGAAAGTGCCGGGCGAGATGGAGATCGAGCCGAGGGAGCGGAGCGAGGAGCTGTCC						: 60
SjuCygb :	ATGGAGAAAGTGCCGGGCGAGATGGAGATCGAGCCGAGGGAGCGGAGCGAGGAGCTGTCC						: 60
RnoCygb :	ATGGAGAAAGTGCCGGGCGACATGGAGATAGAGCCGAGGGAGAGGAGCGAGGAGCTGTCC						: 60
MmuCygb :	ATGGAGAAAGTGCCGGGCGACATGGAGATAGAGCCGAGGGAGAGGAGCGAGGAGCTGTCC						: 60
BtaCygb :	ATGGAGAAAGTGCCGGGCGAGATGGAGATCGAGCCGAGGGAGCGGAGCGAGGAGCTGTCC						: 60
CfaCygb :	ATGGAGAAAGTGCCGGGCGAGATGGAGATCGAGCCGAGGGAGCGGAGCGAGGAGCTGTCC						: 60
HsaCYGB :	ATGGAGAAAGTGCCAGGCGAGATGGAGATCGAGCCGAGGGAGCGGAGCGAGGAGCTGTCC						: 60

	*	80	*	100	*	120	
SgaCygb :	GAGGCGGACAGGAAGGCGGTGCAGGCTACGTGGGCCCGGCTGTATGCCAACTGCGAGGAC						:120
SgoCygb :	GAGGCGGACAGGAAGGCGGTGCAGGCTACGTGGGCCCGGCTGTATGCCAACTGCGAGGAC						:120
ScaCygb :	GAGGCGGACAGGAAGGCGGTGCAGGCTACGTGGGCCCGGCTGTATGCCAACTGCGAGGAC						:120
SjuCygb :	GAGGCGGACAGGAAGGCGGTGCAGGCTACGTGGGCCCGGCTGTATGCCAACTGCGAGGAC						:120
RnoCygb :	GAGGCGGACAGGAAGGCGGTGCAGGCTACGTGGGCCCGGCTGTATGCCAACTGCGAGGAC						:120
MmuCygb :	GAGGCGGACAGGAAGGCGGTGCAGGCTACGTGGGCCCGGCTGTATGCCAACTGCGAGGAC						:120
BtaCygb :	GAGGCGGACAGGAAGGCGGTGCAGGCTACGTGGGCCCGGCTGTATGCCAACTGCGAGGAC						:120
CfaCygb :	GAGGCGGACAGGAAGGCGGTGCAGGCTACGTGGGCCCGGCTGTATGCCAACTGCGAGGAC						:120
HsaCYGB :	GAGGCGGACAGGAAGGCGGTGCAGGCTACGTGGGCCCGGCTGTATGCCAACTGCGAGGAC						:120

	*	140	*	160	*	180	
SgaCygb :	GTGAGGGTGGCCATCCTGGTGAGGTTCTTTGTGAACTTCCCATCAGCCAAGCAGTACTTC						:180
SgoCygb :	GTGAGGGTGGCCATCCTGGTGAGGTTCTTTGTGAACTTCCCATCAGCCAAGCAGTACTTC						:180
ScaCygb :	GTGAGGGTGGCCATCCTGGTGAGGTTCTTTGTGAACTTCCCATCAGCCAAGCAGTACTTC						:180
SjuCygb :	GTGAGGGTGGCCATCCTGGTGAGGTTCTTTGTGAACTTCCCATCAGCCAAGCAGTACTTC						:180
RnoCygb :	GTGAGGGTGGCCATCCTGGTGAGGTTCTTTGTGAACTTCCCATCAGCCAAGCAGTACTTC						:180
MmuCygb :	GTGAGGGTGGCCATCCTGGTGAGGTTCTTTGTGAACTTCCCATCAGCCAAGCAGTACTTC						:180
BtaCygb :	GTGAGGGTGGCCATCCTGGTGAGGTTCTTTGTGAACTTCCCATCAGCCAAGCAGTACTTC						:180
CfaCygb :	GTGAGGGTGGCCATCCTGGTGAGGTTCTTTGTGAACTTCCCATCAGCCAAGCAGTACTTC						:180
HsaCYGB :	GTGAGGGTGGCCATCCTGGTGAGGTTCTTTGTGAACTTCCCATCAGCCAAGCAGTACTTC						:180

	*	200	*	220	*	240	
SgaCygb :	AGCCAGTTCAAACGCATGGAGGAGCCCTGGAAATGGAGCGGAGCCCCAGCTGCGGAAG						:240
SgoCygb :	AGCCAGTTCAAACGCATGGAGGAGCCCTGGAAATGGAGCGGAGCCCCAGCTGCGGAAG						:240
ScaCygb :	AGCCAGTTCAAACGCATGGAGGAGCCCTGGAAATGGAGCGGAGCCCCAGCTGCGGAAG						:240
SjuCygb :	AGCCAGTTCAAACGCATGGAGGAGCCCTGGAAATGGAGCGGAGCCCCAGCTGCGGAAG						:240
RnoCygb :	AGCCAGTTTAAACACATGGAGGATCCCTGGAGATGGAGAGGAGTCCCTCAGCTGCGGAAA						:240
MmuCygb :	AGCCAGTTTAAACACATGGAGGATCCCTGGAGATGGAGAGGAGTCCCTCAGCTGCGGAAA						:240
BtaCygb :	AGCCAGTTCAAAGCACATGGAGGAGCCCTGGAAATGGAGCGGAGCCCCAGCTGCGGAAG						:240
CfaCygb :	AGCCAGTTCAAAGCACATGGAGGAGCCCTGGAGATGGAGCGGAGCCCCAGCTGCGGAAA						:240
HsaCYGB :	AGCCAGTTCAAAGCACATGGAGGATCCCTGGAGATGGAGCGGAGCCCCAGCTGCGGAAG						:240

ANHANG

	*	260	*	280	*	300	
SgaCygb :	CACGCCTGCCGGGT	TATGGGAG	GCCCTCAACACT	GTT	TGTGGAGAACCT	GCATGACCCG	GAC : 300
SgoCygb :	CACGCCTGCCGGGT	TATGGGAG	GCCCTCAACACT	GTT	TGTGGAGAACCT	GCATGACCCG	GAC : 300
ScaCygb :	CACGCCTGCCGGGT	TATGGGAG	GCCCTCAACACT	GTT	TGTGGAGAACCT	GCATGACCCG	GAC : 300
SjuCygb :	CACGCCTGCCGGGT	TATGGGAG	GCCCTCAACACT	GTT	TGTGGAGAACCT	GCATGACCCG	GAC : 300
RnoCygb :	CATGCCTGCCGGGT	CATGGGGG	GCCCTCAACACT	GTT	TGTGGAGAACCT	GCATGACCCG	GAC : 300
MmuCygb :	CACGCCTGCCGGGT	CATGGGGG	GCCCTCAACACT	GTT	TGTGGAGAACCT	GCATGACCCG	GAC : 300
BtaCygb :	CATGCCTGCCGGGT	CATGGGGG	GCCCTCAACACT	GTT	TGTGGAGAACCT	GCATGACCCG	GAG : 300
CfaCygb :	CACGCCTGCCGGGT	CATGGGGG	GCCCTCAACACT	GTT	TGTGGAGAACCT	GCATGACCCG	GAG : 300
HsaCYGB :	CACGCCTGCCGAGT	CATGGGGG	GCCCTCAACACT	GTT	TGTGGAGAACCT	GCATGACCCG	GAC : 300

	*	320	*	340	*	360	
SgaCygb :	AAGGTGTCCTCT	TGTGTTG	TCCCTTGT	CGGCAAG	GCCCACGCCCT	CAAGCACAAA	GTGGAG : 360
SgoCygb :	AAGGTGTCCTCT	TGTGTTG	TCCCTTGT	CGGCAAG	GCCCACGCCCT	CAAGCACAAA	GTGGAG : 360
ScaCygb :	AAGGTGTCCTCT	TGTGTTG	TCCCTTGT	CGGCAAG	GCCCACGCCCT	CAAGCACAAA	GTGGAG : 360
SjuCygb :	AAGGTGTCCTCT	TGTGTTG	TCCCTTGT	CGGCAAG	GCCCACGCCCT	CAAGCACAAA	GTGGAG : 360
RnoCygb :	AAGGTATCCTCT	TGTGTCG	CGCTGGT	TGGCAAG	GCCCACGCCCT	CAAGCACAA	GTGGAA : 360
MmuCygb :	AAGGTATCCTCT	TGTGTCG	CGCTGGT	TGGCAAG	GCCCACGCCCT	CAAGCACAA	GTGGAA : 360
BtaCygb :	AAGGTGTCCTCT	TGTGTCG	CGCTGGT	TGGCAAG	GCCCACGCCCT	CAAGCACAA	GTGGAG : 360
CfaCygb :	AAGGTGTCCTC	CGTGCTG	CGCTTGT	TGGCAAG	GCCCACGCCCT	CAAGCACAA	GTGGAG : 360
HsaCYGB :	AAGGTGTCCTCT	TGTGTCG	CGCTTGT	TGGGAAA	GCCCACGCCCT	CAAGCACAA	GTGGAA : 360

	*	380	*	400	*	420			
SgaCygb :	CCTGTGTA	CTTCAAGAT	CTCTCTGG	GGTCAAT	CTGGAGGT	GATCGCG	GAGGAA	TTTGCC : 420	
SgoCygb :	CCTGTGTA	CTTCAAGAT	CTCTCTGG	GGTCAAT	CTGGAGGT	GATCGCG	GAGGAA	TTTGCC : 420	
ScaCygb :	CCTGTGTA	CTTCAAGAT	CTCTCTGG	GGTCAAT	CTGGAGGT	GATCGCG	GAGGAA	TTTGCC : 420	
SjuCygb :	CCTGTGTA	CTTCAAGAT	CTCTCTGG	GGTCAAT	CTGGAGGT	GATCGCG	GAGGAA	TTTGCC : 420	
RnoCygb :	CCTATGTA	CTTAAAGAT	CTCTCTGG	GGTCAAT	CTGGAG	CGTGAT	CGCG	GAGGAA	TTTGCC : 420
MmuCygb :	CCTATGTA	CTTAAAGAT	CTCTCTGG	GGTCAAT	CTGGAG	CGTGAT	CGCG	GAGGAA	TTTGCC : 420
BtaCygb :	CCCTGTACT	TCAAGAT	CTCTCTGG	AGTCAAT	CTGGAG	GTGAT	CGGT	GAGGAA	TTTGCC : 420
CfaCygb :	CCTGTGTA	CTTCAAGAT	CTCTCTGG	GGTCAAT	CTGGAG	GTGAT	CGCG	GAGGAA	TTTGCC : 420
HsaCYGB :	CCGGTGTACT	TCAAGAT	CTCTCTGG	GGTCAAT	CTGGAG	GTGAT	CGCG	GAGGAA	TTTGCC : 420

	*	440	*	460	*	480			
SgaCygb :	AATGACTT	CCCACCC	GAGACGC	CAGAGAG	CCTGGG	CCAAGCT	GCGTGG	CTCATCTACAGC : 480	
SgoCygb :	AATGACTT	CCCACCC	GAGACGC	CAGAGAG	CCTGGG	CCAAGCT	GCGTGG	CTCATCTACAGC : 480	
ScaCygb :	AATGACTT	CCCACCC	GAGACGC	CAGAGAG	CCTGGG	CCAAGCT	GCGTGG	CTCATCTACAGC : 480	
SjuCygb :	AATGACTT	CCCACCC	GAGACGC	CAGAGAG	CCTGGG	CCAAGCT	GCGTGG	CTCATCTACAGC : 480	
RnoCygb :	AATGACTT	CCC	CGTGG	GAGACGC	CAGAA	AGCCTGG	ACCAAGCT	GCGCG	CTCATCTACAGC : 480
MmuCygb :	AATGACTT	CCCTGTG	GAGACGC	CAGAA	AGCCTGG	CCAAGCT	GCGGG	CTCATCTACAGC : 480	
BtaCygb :	AACGACTT	TTCCC	CCC	GAGACGC	CAGAG	CCTGGG	CCAAGCT	TCCCG	CTCATCTACAGC : 480
CfaCygb :	AATGACTT	CCCACCT	GAGACGC	CAGAG	CCTGGG	CCAAGCT	GCGT	AGCT	CTCATCTACAGC : 480
HsaCYGB :	AGTGACTT	CCCACCT	GAGACGC	CAGAG	CCTGGG	CCAAGCT	GCGTGG	CTCATCTACAGC : 480	

	*	500	*	520	*	540		
SgaCygb :	CACGTGACCG	CTGCCTACA	AGGAAGT	GGGCTGGG	TACAGCAGG	TCCCCAAC	ACCACC	ACC : 540
SgoCygb :	CACGTGACCG	CTGCCTACA	AGGAAGT	GGGCTGGG	TACAGCAGG	TCCCCAAC	ACCACC	ACC : 540
ScaCygb :	CACGTGACCG	CTGCCTACA	AGGAAGT	GGGCTGGG	TACAGCAGG	TCCCCAAC	ACCACC	ACC : 540
SjuCygb :	CACGTGACCG	CTGCCTACA	AGGAAGT	GGGCTGGG	TACAGCAGG	TCCCCAAC	ACCACC	ACC : 540
RnoCygb :	CATGTGACCG	CGCCTACA	AGGAAGT	GGGCTGGG	TACAGCAGG	TCCCCAAC	ACCACC	ACC : 540
MmuCygb :	CACGTGACCG	CAGCCTACA	AGGAAGT	GGGCTGGG	TACAGCAGG	TCCCCAAC	ACCACC	ACC : 540
BtaCygb :	CACGTGACCG	CTGCCTACA	AGGAAGT	GGGCTGGG	TACAGCAGG	TCCCCAAC	ACCACC	ACC : 540
CfaCygb :	CATGTGACCG	CTGCCTACA	AGGAAGT	GGGCTGGG	TACAGCAGG	TCCCCAAC	ACCACC	ACC : 540
HsaCYGB :	CACGTGACCG	CTGCCTACA	AGGAAGT	GGGCTGGG	TACAGCAGG	TCCCCAAC	ACCACC	ACC : 540

ANHANG

```

          *           560           *
SgaCygb : CCACCGGCCACGCTGCCCTCTTCGGGGCCATAG : 573
SgoCygb : CCACCGGCCACGCTGCCCTCTTCGGGGCCATAG : 573
ScaCygb : CCACCGGCCACGCTGCCCTCTTCGGGGCCATAG : 573
SjuCygb : CCACCGGCCACGCTGCCCTCTTCGGGGCCATAG : 573
RnoCygb : CTACCAGCCACACTGCCCTCTTCAGGGCCATAG : 573
MmuCygb : CCACCAGCCACTCTGCCCTCTTCAGGGCCGTA : 573
BtaCygb : CCACCGGCCACGCTGCCCTCTTCGGGGCCATAG : 573
CfaCygb : CCACCGGCCACGCTGCCCTCTTCGGGGCCGTA : 573
HsaCYGB : CCACCGGCCACA CTGCCCTCTTCGGGGCCGTA : 573
    
```

7.4 Anhang 4: Sequenzalignment der kodierenden Bereiche des Myoglobin-Gens ausgewählter Mammalier. (Abk. siehe Anhang 1)

```

          *           20           *           40           *           60
Sca Mb : ATGGGACTCAGCGACGGGGAAATGGCAGCTGGTGCTGAAGCTCTGGGGGAAGCTGGAATCC : 60
Rno Mb : ATGGGGCTCAGTGATGGGGAGTGGCAGATGGTGCTGAACATCTGGGGGAAAGCTGGAGGCC : 60
Mmu Mb : ATGGGGCTCAGTGATGGGGAGTGGCAGCTGGTGCTGAATCTCTGGGGGAAGCTGGAGGCC : 60
Hsa MB : ATGGGGCTCAGCGACGGGGAAATGGCAGCTGGTGCTGAACCTCTGGGGGAAGCTGGAGGCT : 60
    
```

```

          *           80           *           100           *           120
Sca Mb : GACCTTGCTGGCCATGGGCAGGAAGTCCTTATCAAGCTGTTTAAATAATCACCCTGAGACC : 120
Rno Mb : GACCTTGCTGGCCATGGACAGGAAGTCCTCATCAGTCTATTTAAGCTCACCCTGAGACC : 120
Mmu Mb : GACCTTGCTGGCCATGGACAGGAAGTCCTCATCGGCTCTGTTTAAAGACTCACCCTGAGACC : 120
Hsa MB : GACATCCAGGCCATGGGCAGGAAGTCCTCATCAGGCTCTTTAAGGGTCACCAAGAGACT : 120
    
```

```

          *           140           *           160           *           180
Sca Mb : TTGGAGAAGTTTGACAAGTTCAAGAACCTGAAATCCGGAGGATGACATGAAGGGCTCCGGAG : 180
Rno Mb : CTGGAAAAGTTTGACAAGTTCAAGAACCTGAAATCCGGAGGAAAGACATGAAGACTTCAAGAG : 180
Mmu Mb : CTGGATAAGTTTGACAAGTTCAAGAACCTGAAATCCAGAGGAAAGATATGAAGGGCTCAAGAG : 180
Hsa MB : CTGGAGAAGTTTGACAAGTTCAAGCACTGAAATCCAGAGGACGACATGAAGGCATCTGAG : 180
    
```

```

          *           200           *           220           *           240
Sca Mb : GACCTGAAGAAGCATGGCAAACACTGTGCTCACGGCCCTGGGGGGCATCCTGAAGAAGAAA : 240
Rno Mb : GACCTGAAGAAGCACGGCTGCACCGTGCTCACAGCCCTGGGTACCATCCTGAAGAAGAA : 240
Mmu Mb : GACCTGAAGAAGCATGGTTGCACCGTGCTCACAGCCCTGGGTACCATCCTGAAGAAGAA : 240
Hsa MB : GACTTAAGAAGCATGGTGCACACTGTGCTCACCGCCCTGGGTGGCATCCTTAAGAAGAA : 240
    
```

```

          *           260           *           280           *           300
Sca Mb : GGGCAGCACGCTGCAGAGATCCAGCCCTGGCCAGTCCACATGCCACCAAGCACAAGATC : 300
Rno Mb : GGACAACATGCTGCTGAGATCCAGCCCTCTGGCCAGTCCACAGCCACCAAGCACAAGATC : 300
Mmu Mb : GGACAACATGCTGCCGAGATCCAGCCCTCTAGCCCAATCACAGCCACCAAGCACAAGATC : 300
Hsa MB : GGGCATCATGAGGCAGAGATTAAGCCCTGGCAAGTCCGATGCCACCAAGCACAAGATC : 300
    
```

```

          *           320           *           340           *           360
Sca Mb : CCCATCAAGTACCTGGAGTTTATCTCGGAAGCCATCATCCAGGTCCTGCAGAGCAAGCAC : 360
Rno Mb : CCGGTCAAGTACCTGGAGTTTATCTCAGAAGTCATCATCCAAAGTCTGAAGAAAGAGATAT : 360
Mmu Mb : CCGGTCAAGTACCTGGAGTTTATCTCAGAAATTTATCATTTGAAGTCTGAAGAAAGAGACAT : 360
Hsa MB : CCCGTGAAGTACCTGGAGTTTATCTCGGAATGCATCATCCAGGTTCTGCAGAGCAAGCAT : 360
    
```

ANHANG

	*	380	*	400	*	420	
Sca Mb :	CCCCGGAGACTTTGGT	GCAGATGCC	CAGGGC	GCCATGAGCA	AAGGCCCTGGAGCT	CTTCAGG	: 420
Rno Mb :	TCCGGGGACTTTGGAG	CAGATGCT	CAGGGC	GCCATGAGCA	AAGGCCCTGGAGCT	CTTCGG	: 420
Mmu Mb :	TCCGGGGACTTTGGAG	CAGATGCT	CAGGGC	GCCATGAGCA	AAGGCCCTGGAGCT	CTTCGG	: 420
Hsa MB :	CCCCGGGGACTTTGGT	GCTGATGCC	CAGGGC	GCCATGAGCA	AAGGCCCTGGAGCT	CTTCGG	: 420

	*	440	*	460		
Sca Mb :	AATGACATTGCT	GCCAAGTACA	AAGGAGCT	CGGCTTCCAGGGCT	AG	: 465
Rno Mb :	AATGACATTGCT	GCCAAGTACA	AAGGAGCT	CGGCTTCCAGGGCT	GA	: 465
Mmu Mb :	AATGACATTGCT	GCCAAGTACA	AAGGAGCT	AGGCTTCCAGGGCT	GA	: 465
Hsa MB :	AAGGACATGGCT	CCAAC	TACAAGGAGCT	CGGCTTCCAGGGCT	AG	: 465

7.5 Anhang 5: Vektorkarte des Klonierungsvektors pGEM[®]-T Easy (Promega) - aus „Technical Manual: pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems“

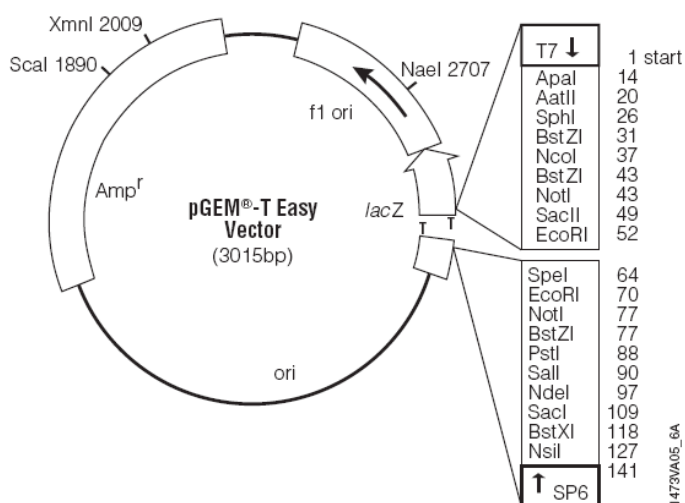


Figure 3. pGEM[®]-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM[®]-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200-216
β-lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

8 Literatur

- Abdul-Khaliq, H. (2002). Untersuchungen zur Entwicklung neuroprotektiver Strategien bei operativer Behandlung angeborener Herzfehler. Deutsches Herzzentrum Berlin. Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Abdul-Khaliq, H., S., S. und G., S.-D. (2000). "Neuroprotective effects of pre-treatment with systemic steroids in a neonatal piglet model of cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest." Eur J Cardiothorac Surg **18**: 729-731.
- Abdul-Khaliq, H., Schubert, S., Schubert, S., Troitzsch, D., Wehsack, A., Böttcher, W., Gutsch, E., Hübler, M., Schmitt, B., Crausaz, M., Schwaller, B., Celio, M., Stoltenburg-Didinger, G., Blasig, I., Volk, H.-D., Liebenthal, C., Hetzer, R. und Lange, P. (2001). "Ein neonatales Schweinmodell zur Evaluierung neuroprotektiver Strategien in der Kinderherzchirurgie." Z Herz Thorax Gefäßchir **15**: 1-8.
- Altschul, S. F., Gish, W., Myera, E. W. und J., L. D. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**: 403-410.
- Andziak, B., O'Connor, T. P. und Buffenstein, R. (2005). "Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat." Mech Ageing Dev **126**(11): 1206-1212.
- Ansari-Lari, M. A., Oeltjen, J. C., Schwartz, S., Zhang, Z., Muzny, D. M., Lu, J., Gorrell, J. H., Chinault, A. C., Belmont, J. W., Miller, W. und Gibbs, R. A. (1998). "Comparative sequence analysis of a gene-rich cluster at human chromosome 12p13 and its syntenic region in mouse chromosome 6." Genome Res **8**(1): 29-40.
- Arieli, R. und Ar, A. (1981). "Heart rate responses of the mole rat (*Spalax ehrenbergi*) in hypercapnic, hypoxic and cold conditions." Physiol Zool **54**: 14-21.
- Arieli, R., Heth, G., Nevo, E. und Hoch, D. (1986). "Hematocrit and hemoglobin concentration in four chromosomal species and some isolated populations of actively speciating subterranean mole rats in Israel." Experientia **42**(4): 441-443.
- Avivi, A., Ashur-Fabian, O., Joel, A., Trakhtenbrot, L., Adamsky, K., Goldstein, I., Amariglio, N., Rechavi, G. und Nevo, E. (2007). "P53 in blind subterranean mole rats - loss-of-function versus gain-of-function activities on newly cloned *Spalax* target genes." Oncogene **26**(17): 2507-2512.
- Avivi, A., Brodsky, L., Nevo, E. und Band, M. R. (2006). "Differential expression profiling of the blind subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi* superspecies: bioprospecting for hypoxia tolerance." Physiol Genomics **27**(1): 54-64.

L I T E R A T U R

- Avivi, A., Oster, H., Joel, A., Beiles, A., Albrecht, U. und Nevo, E. (2002). "Circadian genes in a blind subterranean mammal II: conservation and uniqueness of the three Period homologs in the blind subterranean mole rat, *Spalax ehrenbergi* superspecies." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11718-11723.
- Avivi, A., Resnick, M. B., Nevo, E., Joel, A. und Levy, A. P. (1999). "Adaptive hypoxic tolerance in the subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi*: the role of vascular endothelial growth factor." FEBS Lett **452**(3): 133-140.
- Avivi, A., Shams, I., Joel, A., Lache, O., Levy, A. P. und Nevo, E. (2005). "Increased blood vessel density provides the mole rat physiological tolerance to its hypoxic subterranean habitat." Faseb J **19**(10): 1314-1316.
- Barker, J. N. (1957). "Role of hemoglobin affinity and concentration in determining hypoxia tolerance of mammals during infancy, hypoxia, hyperoxia and irradiation." Am J Physiol **189**(2): 281-289.
- Basnyat, B. und Murdoch, D. R. (2003). "High-altitude illness." Lancet **361**(9373): 1967-1974.
- Bentmann, A., Schmidt, M., Reuss, S., Wolfrum, U., Hankeln, T. und Burmester, T. (2005). "Divergent distribution in vascular and avascular mammalian retinae links neuroglobin to cellular respiration." J Biol Chem **280**(21): 20660-20665.
- Berezikov, E., Guryev, V., Plasterk, R. H. und Cuppen, E. (2004). "CONREAL: conserved regulatory elements anchored alignment algorithm for identification of transcription factor binding sites by phylogenetic footprinting." Genome Res **14**(1): 170-178.
- Beris, P. (1998). "Erythropoietin and erythropoiesis." Haematologica **1**: 126-131.
- Bickler, P. E. und Donohoe, P. H. (2002). "Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia." J Exp Biol **205**(Pt 23): 3579-3586.
- Braunitzer, G., Jelkmann, W., Stangl, A., Schrank, B. und Krombach, C. (1982). "[Hemoglobins, XLVIII: the primary structure of hemoglobin of the Indian elephant (*Elephas maximus*, Proboscidea): beta 2 = Asn]." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **363**(7): 683-691.
- Breen, E. C. (2007). "VEGF in biological control." J Cell Biochem **102**(6): 1358-1367.
- Bronchti, G., Heil, P., Sadka, R., Hess, A., Scheich, H. und Wollberg, Z. (2002). "Auditory activation of "visual" cortical areas in the blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*)." Eur J Neurosci **16**(2): 311-329.

L I T E R A T U R

- Brunori, M., Giuffrè, A., Nienhaus, K., Nienhaus, G. U., Scandurra, F. M. und Vallone, B. (2005). "Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8483-8488.
- Buffenstein, R. (2005). "The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **60**(11): 1369-1377.
- Buffenstein, R. und Jarvis, J. U. (2002). "The naked mole rat--a new record for the oldest living rodent." Sci Aging Knowledge Environ **2002**(21): pe7.
- Bunn, H. F. (1981). "Evolution of mammalian hemoglobin function." Blood **58**(2): 189-197.
- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B. und Hankeln, T. (2002). "Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues." Mol Biol Evol **19**(4): 416-421.
- Burmester, T., Gerlach, F. und Hankeln, T. (2008). "Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia." Adv Exp Med Biol **618**: in press.
- Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., Roesner, A., Schmidt, M., Ebner, B., Gerlach, F., Fuchs, C. und Hankeln, T. (2004). "Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution." IUBMB Life **56**(11-12): 703-707.
- Burmester, T. und Hankeln, T. (2004). "Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system." News Physiol Sci **19**: 110-113.
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S. und Hankeln, T. (2000). "A vertebrate globin expressed in the brain." Nature **407**(6803): 520-523.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-193.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.
- Bustin, S. A. (2004). A-Z of quantitative PCR. La Jolla, IUL-Press.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. und Pfaffl, M. W. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." J Mol Endocrinol **34**(3): 597-601.
- Butler, P. J. und Jones, D. R. (1997). "Physiology of diving of birds and mammals." Physiol Rev **77**(3): 837-899.
- Calvin, N. M. und Hanawalt, P. C. (1988). "High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation." J Bacteriol **170**: 2796-2801.
- Camenisch, G., Stroka, D. M., Gassmann, M. und Wenger, R. H. (2001). "Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression." Pflugers Arch **443**: 240-249.

L I T E R A T U R

- Carleton, M. D. und Musser, G. G. (1984). Muroid rodents. Order and families of recent mammals of the world. Anderson, S. und Jones, J. K. J. New York, Wiley & Sons: 289-380.
- Cernuda-Cernuda, R., DeGrip, W. J., Cooper, H. M., Nevo, E. und Garcia-Fernandez, J. M. (2002). "The retina of *Spalax ehrenbergi*: novel histologic features supportive of a modified photosensory role." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(7): 2374-2383.
- Cheng, W. F., Chen, C. A., Lee, C. N., Wei, L. H., Hsieh, F. J. und Hsieh, C. Y. (2000). "Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma." Obstet Gynecol **96**(5 Pt 1): 721-726.
- Clanton, T. (2007). "Hypoxia-induced reactive oxygen formation in skeletal muscle." J Appl Physiol **in press**.
- Cooper, H. M., Herbin, M. und Nevo, E. (1993). "Visual system of a naturally microphthalmic mammal: the blind mole rat, *Spalax ehrenbergi*." J Comp Neurol **328**(3): 313-350.
- Couture, M., Burmester, T., Hankeln, T. und Rousseau, D. L. (2001). "The heme environment of mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket." J Biol Chem **276**(39): 36377-36382.
- Cvetkovic, D., Movsas, B., Dicker, A. P., Hanlon, A. L., Greenberg, R. E., Chapman, J. D., Hanks, G. E. und Tricoli, J. V. (2001). "Increased hypoxia correlates with increased expression of the angiogenesis marker vascular endothelial growth factor in human prostate cancer." Urology **57**(4): 821-825.
- Czyzyk-Krzeska, M. F. und Beresh, J. E. (1996). "Characterization of the hypoxia-inducible protein binding site within the pyrimidine-rich tract in the 3'-untranslated region of the tyrosine hydroxylase mRNA." J Biol Chem **271**(6): 3293-3299.
- David-Gray, Z. K., Janssen, J. W., DeGrip, W. J., Nevo, E. und Foster, R. G. (1998). "Light detection in a 'blind' mammal." Nat Neurosci **1**(8): 655-656.
- Dawes, G. S., Gardner, W. N., Johnston, B. M. und Walker, D. W. (1983). "Breathing in fetal lambs: the effect of brain stem section." J Physiol **335**: 535-553.
- de Sanctis, D., Dewilde, S., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T. und Bolognesi, M. (2004). "Crystal structure of cytoglobin: the fourth globin type discovered in man displays heme hexa-coordination." J Mol Biol **336**(4): 917-927.
- Dewilde, S., Blaxter, M., Van Hauwaert, M. L., Van Houte, K., Pesce, A., Griffon, N., Kiger, L., Marden, M. C., Vermeire, S., Vanfleteren, J., Esmans, E. und Moens, L. (1998).

L I T E R A T U R

- "Structural, functional, and genetic characterization of *Gastrophilus* hemoglobin." J Biol Chem **273**(49): 32467-32474.
- Dewilde, S., Blaxter, M., Van Hauwaert, M. L., Vanfleteren, J., Esmans, E. L., Marden, M., Griffon, N. und Moens, L. (1996). "Globin and globin gene structure of the nerve myoglobin of *Aphrodite aculeata*." J Biol Chem **271**(33): 19865-19870.
- Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuz, V., Aerts, T., Marden, M. C., Caubergs, R. und Moens, L. (2001). "Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family." J Biol Chem **276**(42): 38949-38955.
- Diaz-Rubio, E. (2006). "Vascular endothelial growth factor inhibitors in colon cancer." Adv Exp Med Biol **587**: 251-275.
- Dickerson, R. E. und Geis, I. (1983). Evolution of the globin family. Hemoglobin: Structure, function, evolution and pathology, Menlo Park: Benjamin/Cummings Pub. Co.
- Doeller, J. E. und Kraus, D. W. (1988). "A physiological comparison of bivalve mollusc cerebrovisceral connectives with and without neurohemoglobin. II. Neurohemoglobin characteristics." Biol. Bull. **174**: 67-76.
- Doll, C. J., Hochachka, P. W. und Reiner, P. B. (1991). "Effects of anoxia and metabolic arrest on turtle and rat cortical neurons." Am J Physiol **260**(4 Pt 2): R747-755.
- Dreidax, D. (2006). Sauerstoffabhängige Regulation der Transkription des Sauerstoffmetabolismus in *Spalax ehrenbergi*. Institut für Molekulargenetik. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Ellsworth, R. E., Jamison, D. C., Touchman, J. W., Chissoe, S. L., Braden Maduro, V. V., Bouffard, G. G., Dietrich, N. L., Beckstrom-Sternberg, S. M., Iyer, L. M., Weintraub, L. A., Cotton, M., Courtney, L., Edwards, J., Maupin, R., Ozersky, P., Rohlfing, T., Wohldmann, P., Miner, T., Kemp, K., Kramer, J., Korf, I., Pepin, K., Antonacci-Fulton, L., Fulton, R. S., Minx, P., Hillier, L. W., Wilson, R. K., Waterston, R. H., Miller, W. und Green, E. D. (2000). "Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1172-1177.
- Erecinska, M. und Silver, I. A. (2001). "Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia." Respir Physiol **128**: 263-276.
- Fago, A., Hundahl, C., Dewilde, S., Gilany, K., Moens, L. und Weber, R. E. (2004). "Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human

L I T E R A T U R

- neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance." J Biol Chem **279**(43): 44417-44426.
- Fago, A., Mathews, A. J., Moens, L., Dewilde, S. und Brittain, T. (2006). "The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b5 and cytochrome c." FEBS Lett **580**(20): 4884-4888.
- Faraci, F. M. (1991). "Adaptations to hypoxia in birds: how to fly high." Annu Rev Physiol **53**: 59-70.
- Ferriero, D. M. (2005). "Protecting neurons." Epilepsia **46 Suppl 7**: 45-51.
- Fink, T., Kazlauskas, A., Poellinger, L., Ebbesen, P. und Zachar, V. (2002). "Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1." Blood **99**: 2077-2083.
- Flögel, U., Gödecke, A., Klotz, L. O. und Schrader, J. (2004). "Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart." Faseb J **18**(10): 1156-1158.
- Flögel, U., Merx, M. W., Gödecke, A., Decking, U. K. und Schrader, J. (2001). "Myoglobin: A scavenger of bioactive NO." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 735-740.
- Fordel, E., Thijs, L., Martinet, W., Lenjou, M., Laufs, T., Van Bockstaele, D., Moens, L. und Dewilde, S. (2006). "Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death." Neurosci Lett **410**(2): 146-151.
- Fordel, E., Thijs, L., Moens, L. und Dewilde, S. (2007). "Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging." Febs J **274**(5): 1312-1317.
- Freitas, T. A., Hou, S., Dioum, E. M., Saito, J. A., Newhouse, J., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M. A. und Alam, M. (2004). "Ancestral hemoglobins in Archaea." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6675-6680.
- Freitas, T. A., Saito, J. A., Hou, S. und Alam, M. (2005). "Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor." J Inorg Biochem **99**(1): 23-33.
- Gardner, P. R. (2005). "Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases." J Inorg Biochem **99**(1): 247-266.
- Gardner, P. R., Gardner, A. M., Brashear, W. T., Suzuki, T., Hvitved, A. N., Setchell, K. D., Olson, J. S. (2006). "Hemoglobins dioxygenate nitric oxide with high fidelity." J Inorg Biochem **100**(4): 542-550.

L I T E R A T U R

- Garrido, E., Segura, R., Capdevila, A., Pujol, J., Javierre, C. und Ventura, J. L. (1996). "Are Himalayan Sherpas better protected against brain damage associated with extreme altitude climbs?" Clin Sci (Lond) **90**(1): 81-85.
- Gerlach, F. (2002). Molekulare Charakterisierung der Globingene Neuroglobin und Cytoglobin bei *Spalax ehrenbergi*. Institut für Molekulargenetik. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Gerlach, F., Avivi, A., Joel, A., Burmester, T., Nevo, E. und Hankeln, T. (2006). "Genomic organization and molecular evolution of the genes for neuroglobin and cytoglobin in the hypoxia-tolerant Israeli mole rat, *Spalax ehrenbergi*." Isr J Ecol Evol **52**: 389-403.
- Geuens, E., Brouns, I., Flamez, D., Dewilde, S., Timmermans, J. P. und Moens, L. (2003). "A globin in the nucleus!" J Biol Chem **278**(33): 30417-30420.
- Gödecke, A. (2006). "On the impact of NO-globin interactions in the cardiovascular system." Cardiovasc Res **69**(2): 309-317.
- Gong, L., Pitari, G. M., Schulz, S. und Waldman, S. A. (2004). "Nitric oxide signaling: systems integration of oxygen balance in defense of cell integrity." Curr Opin Hematol **11**(1): 7-14.
- Gorr, T. A., Tomita, T., Wappner, P. und Bunn, H. F. (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." J Biol Chem **279**(34): 36048-36058.
- Gow, A. J. (2005). "Nitric oxide, hemoglobin, and hypoxic vasodilation." Am J Respir Cell Mol Biol **32**(6): 479-482.
- Grad, Y. H., Roth, F. P., Halfon, M. S. und Church, G. M. (2004). "Prediction of similarly acting cis-regulatory modules by subsequence profiling and comparative genomics in *Drosophila melanogaster* and *D.pseudoobscura*." Bioinformatics **20**(16): 2738-2750.
- Graham, J. B., Dudley, R., Aguilar, N. M. und Gans, C. (1995). "Implications of the late Palaeozoic oxygen pulse for physiology and evolution." Nature Lond **375**: 117-120.
- Greenberg, D. A., Jin, K. und Khan, A. A. (2007). "Neuroglobin: an endogenous neuroprotectant." Curr Opin Pharmacol.
- Grow, J. und Barks, J. D. (2002). "Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts." Clin Perinatol **29**(4): 585-602, v.
- Grzimek, B. (2000). Grzimeks Tierleben - Säugetiere 2. Augsburg.
- Guba, M., Seeliger, H., Kleespies, A., Jauch, K. W. und Bruns, C. (2004). "Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer." Int J Colorectal Dis **19**(6): 510-517.

L I T E R A T U R

- Guo, X., Philipsen, S. und Tan-Un, K. C. (2007). "Study of the hypoxia-dependent regulation of human CYGB gene." Biochem Biophys Res Commun **364**(1): 145-150.
- Gurnett, A. M., O'Connell, J. P., Harris, D. E., Lehmann, H., Joysey, K. A. und Nevo, E. (1984). "The myoglobin of rodents: *Lagostomus maximus* (viscacha) and *Spalax ehrenbergi* (mole rat)." J Prot Chem **3**: 445-454.
- Hackett, P. H. und Rennie, D. (1976). "The incidence, importance, and prophylaxis of acute mountain sickness." Lancet **2**: 1149-1155.
- Hackett, P. H. und Rennie, D. (1979). "Rales, peripheral edema, retinal hemorrhage and acute mountain sickness." Am J Med **67**: 214-218.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl Acids Symp Ser **41**: 95-98.
- Halliwell, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" J Neurochem **97**: 1634-1658.
- Halliwell, B. und Cross, C. E. (1994). "Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress." Environ Health Perspect **102 Suppl 10**: 5-12.
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B. N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L. und Marden, M. C. (2003). "The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin." J Biol Chem **278**(51): 51713-51721.
- Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T. L., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M. C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R. E., Fago, A. und Burmester, T. (2005). "Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family." J Inorg Biochem **99**(1): 110-119.
- Hankeln, T., Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Gerlach, F., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S. und Burmester, T. (2004). "The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function?" IUBMB Life **56**(11-12): 671-679.
- Hardison, R. C. (1996). "A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5675-5679.
- Hardison, R. C., Oeltjen, J. und Miller, W. (1997). "Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome." Genome Res **7**(10): 959-966.
- Hargittai, P. T. und Lieberman, E. M. (1991). "Axon-glia interactions in the crayfish: glial cell oxygen consumption is tightly coupled to axon metabolism." Glia **4**(4): 417-423.

L I T E R A T U R

- Hargrove, M. S., Brucker, E. A., Stec, B., Sarath, G., Arredondo-Peter, R., Klucas, R. V., Olson, J. S. und Phillips, G. N., Jr. (2000). "Crystal structure of a nonsymbiotic plant hemoglobin." Structure **8**(9): 1005-1014.
- Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S. und Floyd, R. A. (2000). "Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury." Free Radic Biol Med **28**: 1456-1462.
- Herold, S. und Fago, A. (2005). "Reactions of peroxynitrite with globin proteins and their possible physiological role." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **142**(2): 124-129.
- Heth, G., Frankenberg, E. und Nevo, E. (1986). "Adaptive optimal sound for vocal communication in tunnels of a subterranean mammal (*Spalax ehrenbergi*)." Experientia **42**(11-12): 1287-1289.
- Heth, G., Frankenberg, E. und Nevo, E. (1988). "„Courtship“ call of subterranean mole rats (*Spalax ehrenbergi*): Physical analysis." J. Mamm. **69**: 121-125.
- Heth, G., Frankenberg, E., Raz, A. und Nevo, E. (1987). "Vibrational communication in subterranean mole rats (*Spalax ehrenbergi*)." Behav. Ecol. Sociobiol. **21**: 31-33.
- Hochachka, P. W. (2000). "Pinniped diving response mechanism and evolution: a window on the paradigm of comparative biochemistry and physiology." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **126**(4): 435-458.
- Hochachka, P. W. und Lutz, P. L. (2001). "Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **130**(4): 435-459.
- Hochachka, P. W. und Rupert, J. L. (2003). "Fine tuning the HIF-1 'global' O₂ sensor for hypobaric hypoxia in Andean high-altitude natives." Bioessays **25**(5): 515-519.
- Hochachka, P. W., Stanley, C., Merkt, J. und Sumar-Kalinowski, J. (1983). "Metabolic meaning of elevated levels of oxidative enzymes in high altitude adapted animals: an interpretive hypothesis." Respir Physiol **52**(3): 303-313.
- Hopkins, S. R. und Powell, F. L. (2001). "Common themes of adaptation to hypoxia. Insights from comparative physiology." Adv Exp Med Biol **502**: 153-167.
- Hoppeler, H. und Vogt, M. (2001). "Muscle tissue adaptations to hypoxia." J Exp Biol **204**(Pt 18): 3133-3139.
- Horn, E. M. und Waldrop, T. G. (1997). "Oxygen-sensing neurons in the caudal hypothalamus and their role in cardiorespiratory control." Respir Physiol **110**: 219-228.

L I T E R A T U R

- Hou, S., Belisle, C., Lam, S., Piatibratov, M., Sivozhelezov, V., Takami, H. und Alam, M. (2001). "A globin-coupled oxygen sensor from the facultatively alkaliphilic *Bacillus halodurans* C-125." Extremophiles **5**(5): 351-354.
- Hou, S., Freitas, T., Larsen, R. W., Piatibratov, M., Sivozhelezov, V., Yamamoto, A., Meleshkevitch, E. A., Zimmer, M., Ordal, G. W. und Alam, M. (2001). "Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in Archaea and Bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9353-9358.
- Hundahl, C., Stoltenberg, M., Fago, A., Weber, R. E., Dewilde, S., Fordel, E. und Danscher, G. (2005). "Effects of short-term hypoxia on neuroglobin levels and localization in mouse brain tissues." Neuropathol Appl Neurobiol **31**(6): 610-617.
- Ignarro, L. J. (2002). "Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview." J Physiol Pharmacol **53**(4 Pt 1): 503-514.
- Issels, R. D. (2006). "High-risk soft tissue sarcoma: clinical trial and hyperthermia combined chemotherapy." Int J Hyperthermia **22**(3): 235-239.
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M. J., Kaufman, E. und Sokoloff, L. (2003). "Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4879-4884.
- Jonas, R. A. und Volpe, J. J. (1996). Brain injury and pediatric surgery. Oxford, England, Butterworth Heinemann.
- Jones, N. M. und Bergeron, M. (2001). "Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain." J Cereb Blood Flow Metab **21**(9): 1105-1114.
- Kanatous, S. B., Davis, R. W., Watson, R., Polasek, L., Williams, T. M. und Mathieu-Costello, O. (2002). "Aerobic capacities in the skeletal muscles of Weddell seals: key to longer dive durations?" J Exp Biol **205**(Pt 23): 3601-3608.
- Kashi, Y. und King, D. G. (2006). "Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution." Trends Genetics **22**: 253-259.
- Kawada, N., Kristensen, D. B., Asahina, K., Nakatani, K., Minamiyama, Y., Seki, S. und Yoshizato, K. (2001). "Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells." J Biol Chem **276**(27): 25318-25323.
- Kelly, D. A. und Storey, K. B. (1988). "Organ-specific control of glycolysis in anoxic turtles." Am J Physiol **255**(5 Pt 2): R774-779.

L I T E R A T U R

- Khan, A. A., Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Chen, S., Ellerby, L. M. und Greenberg, D. A. (2007). "A neuroglobin-overexpressing transgenic mouse." Gene **398**(1-2): 172-176.
- Khan, A. A., Wang, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., Miles, E., Graboski, J., Chen, S., Ellerby, L. M., Jin, K. und Greenberg, D. A. (2006). "Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17944-17948.
- Kiger, L., Uzan, J., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., Hamdane, D., Baudin-Creuzat, V. und Marden, M. (2004). "Neuroglobin ligand binding kinetics." IUBMB Life **56**(11-12): 709-719.
- Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M. und Esumi, H. (2001).
- Kleinschmidt, T., Nevo, E., Goodman, M. und Braunitzer, G. (1985). "Mole rat hemoglobin: primary structure and evolutionary aspects in a second karyotype of *Spalax ehrenbergi*, Rodentia, (2n = 52)." Biol Chem Hoppe Seyler **366**(7): 679-685.
- Koos, B. J., Chau, A., Matsuura, M., Punla, O. und Kruger, L. (1998). "Thalamic locus mediates hypoxic inhibition of breathing in fetal sheep." J Neurophysiol **79**(5): 2383-2393.
- Kooyman, G. L. und Ponganis, P. J. (1998). "The physiological basis of diving to depth: birds and mammals." Annu Rev Physiol **60**: 19-32.
- Kraus, D. W. und Colacino, J. M. (1986). "Extended Oxygen Delivery from the Nerve Hemoglobin of *Tellina alternata* (Bivalvia)." Science **232**(4746): 90-92.
- Kriegel, J. M., Bhattacharyya, A. J., Nienhaus, K., Deng, P., Minkow, O. und Nienhaus, G. U. (2002). "Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7992-7997.
- Kumerloeve, H. (1955). "Spalax und Skorpione als Steinkauz-Nahrung." Die Vogelwelt **76**: 110.
- Laufs, T. L., Wystub, S., Reuss, S., Burmester, T., Saaler-Reinhardt, S. und Hankeln, T. (2004). "Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals." Neurosci Lett **362**(2): 83-86.
- Leone, A. M., Palmer, R. M., Knowles, R. G., Francis, P. L., Ashton, D. S. und Moncada, S. (1991). "Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline." J Biol Chem **266**(35): 23790-23795.

L I T E R A T U R

- Li, D., Chen, X. Q., Li, W. J., Yang, Y. H., Wang, J. Z. und Yu, A. C. (2007). "Cytoglobin up-regulated by hydrogen peroxide plays a protective role in oxidative stress." Neurochem Res **32**(8): 1375-1380.
- Li, R. C., Lee, S. K., Pouranfar, F., Brittian, K. R., Clair, H. B., Row, B. W., Wang, Y. und Gozal, D. (2006). "Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain." Brain Res **1096**(1): 173-179.
- Lipton, P. (1999). "Ischemic cell death in brain neurons." Physiol Rev **79**: 1431-1568.
- Liu, L., Zeng, M., Hausladen, A., Heitman, J. und Stamler, J. S. (2000). "Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4672-4676.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. und Deetz, K. (1995). "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization." PCR Methods Appl **4**(6): 357-362.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Luft, F., Klaes, R., Nees, M., Durst, M., Heilmann, V., Melsheimer, P. und von Knebel Doeberitz, M. (2001). "Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells." Int J Cancer **92**(1): 9-17.
- Lutz, P. L. (1992). "Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain." Annu Rev Physiol **54**: 601-618.
- Lutz, P. L., Nilsson, G. E. und Perez-Pinzon, M. A. (1996). "Anoxia tolerant animals from a neurobiological perspective." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **113**(1): 3-13.
- Lutz, P. L., Rosenthal, M. und Sick, T. (1985). "Living without oxygen: turtle brain as a model of anaerobic metabolism." Mol Physiol **8**: 411-425.
- MacArthur, R. A. (1990). "Seasonal changes in the oxygen storage capacity and aerobic dive limits of the muskrat (*Ondatra zibethicus*)." J Comp Physiol B **160**: 593-599.
- Mammen, P. P., Shelton, J. M., Goetsch, S. C., Williams, S. C., Richardson, J. A., Garry, M. G. und Garry, D. J. (2002). "Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain." J Histochem Cytochem **50**(12): 1591-1598.

L I T E R A T U R

- Martin-Body, R. L. und Johnston, B. M. (1988). "Central origin of the hypoxic depression of breathing in the newborn." Respir Physiol **71**(1): 25-32.
- Maxwell, P. H., Pugh, C. W. und Ratcliffe, P. J. (2001). "Activation of the HIF pathway in cancer." Curr Opin Genet Dev **11**(3): 293-299.
- Mazure, N. M., Chauvet, C., Bois-Joyeux, B., Bernard, M. A., Nacer-Cherif, H. und Danan, J. L. (2002). "Repression of alpha-fetoprotein gene expression under hypoxic conditions in human hepatoma cells: characterization of a negative hypoxia response element that mediates opposite effects of hypoxia inducible factor-1 and c-Myc." Cancer Res **62**(4): 1158-1165.
- McIntyre, I. W., Campbell, K. L. und MacArthur, R. A. (2002). "Body oxygen stores, aerobic dive limits and diving behaviour of the star-nosed mole (*Condylura cristata*) and comparisons with non-aquatic talpids." J Exp Biol **205**(Pt 1): 45-54.
- Merx, M. W., Fogel, U., Stumpe, T., Godecke, A., Decking, U. K. und Schrader, J. (2001). "Myoglobin facilitates oxygen diffusion." Faseb J **15**(6): 1077-1079.
- Merx, M. W., Godecke, A., Fogel, U. und Schrader, J. (2005). "Oxygen supply and nitric oxide scavenging by myoglobin contribute to exercise endurance and cardiac function." Faseb J **19**(8): 1015-1017.
- Mienis, H. K. (1982). "A case of multiple predation on the levant mole rat by *Vipera palaestinae* Werner 1938 (Reptilia: Serpentes. Viperidae)." Salamandra **18**(3/4): 359.
- Minning, D. M., Gow, A. J., Bonaventura, J., Braun, R., Dewhirst, M., Goldberg, D. E. und Stamler, J. S. (1999). "Ascaris haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase'." Nature **401**(6752): 497-502.
- Miyazaki, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., Nishiyama, M., Honda, H. und Kato, Y. (2002). "Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes." J Biol Chem **277**: 47014-47021.
- Moncada, S., Palmer, R. M. und Higgs, E. A. (1988). "The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator." Hypertension **12**(4): 365-372.
- Moncada, S., Radomski, M. W. und Palmer, R. M. (1988). "Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function." Biochem Pharmacol **37**(13): 2495-2501.
- Monge, C. und Leon-Velarde, F. (1991). "Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds." Physiol Rev **71**(4): 1135-1172.

L I T E R A T U R

- Moro, M. A., Almeida, A., Bolanos, J. P. und Lizasoain, I. (2005). "Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke." Free Radical Biology & Medicine **39**: 1291-1304.
- Moro, M. A., Cárdenas, A., Leza, J. C. und Lizasoain, I. (2004). "Role of nitric oxide after brain ischaemia." Cell Calcium **36**: 265-275.
- Mu, D., Jiang, X., Sheldon, R. A., Fox, C. K., Hamrick, S. E., Vexler, Z. S. und Ferriero, D. M. (2003). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model." Neurobiol Dis **14**(3): 524-534.
- Murdoch, D. R. (1995). "Altitude illness among tourists flying to 3740 meters elevation in the Nepal Himalayas." J Travel Med **2**: 255-256.
- Nakatani, K., Okuyama, H., Shimahara, Y., Saeki, S., Kim, D. H., Nakajima, Y., Seki, S., Kawada, N. und Yoshizato, K. (2004). "Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis." Lab Invest **84**(1): 91-101.
- Narravula, S. und Colgan, S. P. (2001). "Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression during hypoxia." J Immunol **166**(12): 7543-7548.
- Nei, M. und Gojobori, T. (1986). "Simple methods for estimating the numbers of synonymous and non-synonymous nucleotide substitutions." Mol Biol Evol **3**: 418-426.
- Neubauer, J. A. und Sunderram, J. (2004). "Oxygen-sensing neurons in the central nervous system." J Appl Physiol **96**(1): 367-374.
- Nevo, E. (1999). Mosaic evolution of subterranean mammals: Regression, progression and global convergence. Oxford, Oxford University Press.
- Nevo, E., Ivanitskaya, E. und Beiles, A. (2001). Adaptive Radiation of Blind Subterranean Mole Rats. Leiden, Backhuys Publishers.
- Nilsson, G. E., Rosén, P. und Johansson, D. (1993). "Anoxic depression of spontaneous locomotor activity in crucian carp quantified by a computerized imaging technique." J Exp Biol **180**: 153-162.
- Nowak, R. (1999). Walker's mammals of the world, v. 2. Baltimore und London, The John Hopkins University Press.
- Ouellet, H., Ouellet, Y., Richard, C., Labarre, M., Wittenberg, B., Wittenberg, J. und Guertin, M. (2002). "Truncated hemoglobin HbN protects Mycobacterium bovis from nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 5902-5907.

L I T E R A T U R

- Palmer, L. A., Semenza, G. L., Stoler, M. H. und Johns, R. A. (1998). "Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1." Am J Physiol **274**(2 Pt 1): L212-219.
- Paulding, W. R. und Czyzyk-Krzeska, M. F. (2000). "Hypoxia-induced regulation of mRNA stability." Adv Exp Med Biol **475**: 111-121.
- Perez-Pinzon, M. A., Rosenthal, M., Lutz, P. L. und Sick, T. J. (1992). "Anoxic survival of the isolated cerebellum of the turtle *Pseudemys scripta elegans*." J Comp Physiol [B] **162**(1): 68-73.
- Perlman, J. M. (1997). "Intrapartum hypoxic-ischemic cerebral injury and subsequent cerebral palsy: medicolegal issues." Pediatrics **99**(6): 851-859.
- Piiper, J. und Scheid, P. (1975). "Gas transport efficacy of gills, lungs and skin: theory and experimental data." Respir Physiol **23**(2): 209-221.
- Ramirez, J. M., Folkow, L. P. und Blix, A. S. (2006). "Hypoxia Tolerance in Mammals and Birds: From the Wilderness to the Clinic." Annu Rev Physiol **69**: 18.11-18.31.
- Ramirez, J. M., Folkow, L. P. und Blix, A. S. (2007). "Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic." Annu Rev Physiol **69**: 113-143.
- Rebeiz, M. und Posakony, J. W. (2004). "GenePalette: a universal software tool for genome sequence visualization and analysis." Dev Biol **271**: 431-438.
- Reed, J. Z., Butler, P. J. und Fedak, M. A. (1994). "The metabolic characteristics of the locomotory muscles of grey seals (*Halichoerus grypus*), harbour seals (*Phoca vitulina*) and Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*)." J Exp Biol **194**: 33-46.
- Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M. H., Burmester, T. und Hankeln, T. (2002). "Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues." Neuroscience **115**(3): 645-656.
- Reyes, A., Gissi, C., Catzeflis, F., Nevo, E., Pesole, G. und Saccone, C. (2004). "Congruent mammalian trees from mitochondrial and nuclear genes using Bayesian methods." Mol Biol Evol **21**(2): 397-403.
- Reynafarje, C., Faura, J., Villavicencio, D., Curaca, A., Reynafarje, B., Oyola, L., Contreras, L., Vallenas, E. und Faura, A. (1975). "Oxygen transport of hemoglobin in high-altitude animals (Camelidae)." J Appl Physiol **38**(5): 806-810.
- Rollini, P., Namciu, S. J., Marsden, M. D. und Fournier, R. E. (1999). "Identification and characterization of nuclear matrix-attachment regions in the human serpin gene cluster at 14q32.1." Nucl Acids Res **27**: 3779-3791.

L I T E R A T U R

- Scandurro, A. B. und Beckman, B. S. (1998). "Common proteins bind mRNAs encoding erythropoietin, tyrosine hydroxylase, and vascular endothelial growth factor." Biochem Biophys Res Commun **246**(2): 436-440.
- Schimojo, M., Lee, J. B. und Hersh, L. B. (2001). "Role of zinc finger domains of the transcription factor NRSF/REST in DNA binding and nuclear localization." J Biol Chem **276**: 13121–13126.
- Schmidt, M., Gerlach, F., Avivi, A., Laufs, T., Wystub, S., Simpson, J. C., Nevo, E., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T. und Burmester, T. (2004). "Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia." J Biol Chem **279**(9): 8063-8069.
- Schmidt, M., Giessl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U. und Burmester, T. (2003). "How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina." J Biol Chem **278**(3): 1932-1935.
- Schmidt, M., Laufs, T., Reuss, S., Hankeln, T. und Burmester, T. (2005). "Divergent distribution of cytoglobin and neuroglobin in the murine eye." Neurosci Lett **374**(3): 207-211.
- Schneider, B. P. und Sledge, G. W., Jr. (2007). "Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer." Nat Clin Pract Oncol **4**(3): 181-189.
- Schnell, S. A., Staines, W. A. und Wessendorf, M. W. (1999). "Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue." J Histochem Cytochem **47**(6): 719-730.
- Schoenherr, C. J. und Anderson, D. J. (1995). "The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes." Science **267**: 1360-1363.
- Schoenherr, C. J., Paquette, A. J. und Anderson, D. J. (1996). "Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9881-9886.
- Scholander, P. F. (1940). "Experimental investigations on the respiratory function in diving mammals and birds." Hvalradets Skrif. **22**: 1-131.
- Schubert, S., Stoltenburg-Didinger, G., Wehsack, A., Troitzsch, D., Boettcher, W., Huebler, M., Redlin, M., Kanaan, M., Meissler, M., Lange, P. E. und Abdul-Khaliq, H. (2005). "Large-dose pretreatment with methylprednisolone fails to attenuate neuronal injury after deep hypothermic circulatory arrest in a neonatal piglet model." Anesth Analg **101**(5): 1311-1318.

L I T E R A T U R

- Schülke, S. (2007). Molekulare Analyse von Genen der Oxidantien-Abwehr in der hypoxietoleranten Blindmulle *Spalax ehrenbergi*. Institut für Molekulargenetik. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Schwartz, S., Zhang, Z., Frazer, K. A., Smit, A., Riemer, C., Bouck, J., Gibbs, R., Hardison, R. und Miller, W. (2000). "PipMaker-a web server for aligning two genomic DNA sequences." Genome Res **10**: 577-587.
- Semenza, G. L. (2007). "Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway." Sci STKE **2007**(407): cm8.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. und Giallongo, A. (1996). "Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1." J Biol Chem **271**(51): 32529-32537.
- Semenza, G. L. und Wang, G. L. (1992). "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation." Mol Cell Biol **12**(12): 5447-5454.
- Shams, I., Avivi, A. und Nevo, E. (2004). "Hypoxic stress tolerance of the blind subterranean mole rat: expression of erythropoietin and hypoxia-inducible factor 1 alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9698-9703.
- Shams, I., Avivi, A. und Nevo, E. (2005). "Oxygen and carbon dioxide fluctuations in burrows of subterranean blind mole rats indicate tolerance to hypoxic-hypercapnic stresses." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **142**(3): 376-382.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. und Keshet, E. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-845.
- Siesjö, B. K. (1978). Brain energy metabolism. Chichester, Wiley.
- Sirover, M. A. (1999). "New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." Biochim Biophys Acta **1432**(2): 159-184.
- Smit, A. F. (1996). "The origin of interspersed repeats in the human genome." Curr Opin Genet Dev **6**: 743-748.
- Smit, A. F. A., Hubley, R. und Green, P. (1996-2004). "RepeatMasker Open 3.0 Software."
- Snyder, G. K. (1983). "Respiratory adaptations in diving mammals." Respir Physiol **54**(3): 269-294.

L I T E R A T U R

- Snyder, S. H. und Bredt, D. S. (1992). "Biological roles of nitric oxide." Sci Am **266**(5): 68-71, 74-67.
- Solomon, I. C., Edelman, N. H. und Neubauer, J. A. (2000). "Pre-Botzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo." J Neurophysiol **83**(5): 2854-2868.
- Sowa, A. W., Duff, S. M. G., Guy, P. A. und Hill, R. D. (1998). "Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 10317-10321.
- Spanakis, E. (1993). "Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls." Nucleic Acids Res **21**(16): 3809-3819.
- Storey, K. B. (1996). "Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **113**(1): 23-35.
- Storey, K. B. (2007). "Anoxia tolerance in turtles: metabolic regulation and gene expression." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **147**(2): 263-276.
- Storier, D., Wollberg, Z. und Ar, A. (1981). "Low and nonrhythmic heart rate of the molr rat (*Spalax ehrenbergi*): Control by the autonomic nervous system." J Comp Physiol **142**: 533-538.
- Sun, M.-K. und Reis, D. J. (1994). "Hypoxia selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **266**: R245-R256.
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y. und Greenberg, D. A. (2001). "Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15306-15311.
- Sun, Y., Jin, K., Peel, A., Mao, X. O., Xie, L. und Greenberg, D. A. (2003). "Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3497-3500.
- Swan, L. W. (1970). "Goose of the Himalaya." Nat Hist **79**: 68-75.
- Terrados, N., Jansson, E., Sylven, C. und Kaijser, L. (1990). "Is hypoxia a stimulus for synthesis of oxidative enzymes and myoglobin?" J Appl Physiol **68**(6): 2369-2372.
- Thiel, G., Lietz, M. und Cramer, M. (1998). "Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes." J Biol Chem **273**(41): 26891-26899.

L I T E R A T U R

- Trandafir, F., Hoogewijs, D., Altieri, F., Rivetti di Val Cervo, P., Ramser, K., Van Doorslaer, S., Vanfleteren, J. R., Moens, L. und Dewilde, S. (2007). "Neuroglobin and cytoglobin as potential enzyme or substrate." Gene **398**(1-2): 103-113.
- Trent, J. T., 3rd und Hargrove, M. S. (2002). "A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin." J Biol Chem **277**(22): 19538-19545.
- Trent, J. T., 3rd, Watts, R. A. und Hargrove, M. S. (2001). "Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen." J Biol Chem **276**(32): 30106-30110.
- Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R. und Misra, M. K. (2004). "Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology." J Biomed Biotechnol **2004**(4): 227-237.
- Van der Boon, J., de Jong, R. L., Van den Thillart, G. E. und Addink, A. D. (1992). "Reversed-phase ion-paired HPLC of purine nucleotides from skeletal muscle, heart and brain of the goldfish, *Carassius auratus* L.--II. Influence of environmental anoxia on metabolite levels." Comp Biochem Physiol B **101**(4): 583-586.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. und Speleman, F. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.
- Vaupel, P. und Harrison, L. (2004). "Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response." Oncologist **9 Suppl 5**: 4-9.
- Vaupel, P., Thews, O., Mayer, A., Hockel, S. und Hockel, M. (2002). "Oxygenation status of gynecologic tumors: what is the optimal hemoglobin level?" Strahlenther Onkol **178**(12): 727-731.
- Walter, R., Maggiorini, M., Scherrer, U., Contesse, J. und Reinhart, W. H. (2001). "Effects of high-altitude exposure on vascular endothelial growth factor levels in man." Eur J Appl Physiol **85**(1-2): 113-117.
- Wang, G. L. und Semenza, G. L. (1993). "Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia." J Biol Chem **268**(29): 21513-21518.
- Wang, G. L. und Semenza, G. L. (1993). "Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction." Blood **82**(12): 3610-3615.
- Wang, G. L. und Semenza, G. L. (1993). "General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 4304-4308.

L I T E R A T U R

- Wang, X. L., Sim, A. S., Badenhop, R. F., McCredie, R. M. und Wilcken, D. E. (1996). "A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene." Nat Med **2**(1): 41-45.
- Wasserman, W. W., Palumbo, M., Thompson, W., Fickett, J. W. und Lawrence, C. E. (2000). "Human-mouse genome comparisons to locate regulatory sites." Nat Genet **26**(2): 225-228.
- Watts, R. A., Hunt, P. W., Hvitved, A. N., Hargrove, M. S., Peacock, W. J. und Dennis, E. S. (2001). "A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10119-10124.
- Weber, R. E. und Fago, A. (2004). "Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins." Respir Physiol Neurobiol **144**(2-3): 141-159.
- Weber, R. E. und Vinogradov, S. N. (2001). "Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations." Physiol Rev **81**(2): 569-628.
- West, J. B. (2004). "The physiologic basis of high-altitude diseases." Ann Intern Med **141**(10): 789-800.
- Widmer, H. R., Hoppeler, H., Nevo, E., Taylor, C. R. und Weibel, E. R. (1997). "Working underground: respiratory adaptations in the blind mole rat." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 2062-2067.
- Wiener, C. M., Booth, G. und Semenza, G. L. (1996). "In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1." Biochem Biophys Res Commun **225**(2): 485-488.
- Wittenberg, B. A., Briehl, R. W. und Wittenberg, J. B. (1965). "Haemoglobins of invertebrate tissues. Nerve haemoglobins of Aphrodite, Aplysia and Halosydna." Biochem J **96**(2): 363-371.
- Wittenberg, J. B. (1992). "Functions of cytoplasmic hemoglobins and myohemerythrin." Adv. Comp. Environ. Physiol. **13**: 60-85.
- Wittenberg, J. B., Bolognesi, M., Wittenberg, B. A. und Guertin, M. (2002). "Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants." J Biol Chem **277**(2): 871-874.
- Wittenberg, J. B. und Wittenberg, B. A. (2003). "Myoglobin function reassessed." J Exp Biol **206**(Pt 12): 2011-2020.

L I T E R A T U R

- Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R. und Schlag, P. M. (2002). "Hyperthermia in combined treatment of cancer." Lancet Oncol **3**(8): 487-497.
- Wystub, S. (2007). Expressions- und Funktionsanalysen von Neuroglobin und Cytoglobin. Institut für Molekulargenetik. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Wystub, S., Ebner, B., Fuchs, C., Weich, B., Burmester, T. und Hankeln, T. (2004). "Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements." Cytogenet Genome Res **105**(1): 65-78.
- Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Burmester, T., Maas, U., Saaler-Reinhardt, S., Hankeln, T. und Reuss, S. (2003). "Localization of neuroglobin protein in the mouse brain." Neurosci Lett **346**(1-2): 114-116.

9 Danksagung

Mein großer Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Molekulargenetik sowie allen Mitarbeitern der Firma GENTERprise.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt und mir dieses Studium ermöglicht haben. Meiner ganzen Familie und meinen Freunden möchte ich für die Hilfe und Unterstützung während meiner Studien- sowie Promotionszeit danken.

10 Lebenslauf

Name: Frank Gerlach

Adresse:

Telefon:

E-Mail: fgerlach(at)gmx.de

Geburtsdatum: 24.05.1977

Geburtsort: Bad Kreuznach

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsgang

1983 – 1987 Grundschole Bingen-Bingerbrück

1987 – 1996 Stefan-George-Gymnasium, Bingen

April 1997 – Juni 2002 Studium der Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

März 2001 Diplom-Prüfung in Biologie

April 2001 – Juni 2002 Diplomarbeit am Institut für Molekulargenetik Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Oktober 2001 – Februar 2002 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Molekulargenetik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Juli 2002 - Mai 2006 Vorbereitung zur Promotion am Institut für Molekulargenetik bei Professor Dr. T. Hankeln, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

LEBENS LAUF

seit Juni 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Biozentrum Grindel,
Tierphysiologie bei Professor Dr. T. Burmester,
Universität Hamburg

Außeruniversitäre Tätigkeiten

August-Oktober 1999 Praktikum bei DAIMLERCHRYSLER

seit Februar 2001 Mitglied im Jurorenteam von „Jugend forscht“

Tagungsteilnahme

September 2003 13th international conference on invertebrate
dioxygen binding proteins, Mainz

März 2004 1st international qPCR symposium Freising-
Weihenstephan

September 2004 Mid-term meeting of EU-network „Ngb and the
survival of the neuron“, Genua

September 2004 3. Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik,
Weimar

August 2005 Meeting of EU-network „Ngb and the
survival of the neuron“, Paris

Fortbildungsveranstaltungen:

Januar 2003 ABI Prism 7000 SDS Basic Training

November 2001 – März 2002 Existenzgründer-Programm Prof. Dr. R. Bronner
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

2002-2006 Besuch diverser Veranstaltungen zum Thema
Genexpressionsanalyse, Realtime PCR der Firmen
Applied Biosystems und Qiagen

September 2003 Seminar: Sicherheit in der Gentechnik

Oktober 2002 – März 2003 Seminar: Einführung in den Wissenschafts-
journalismus

Mai 2005 EMBO Kurs zur Realtime PCR, Heidelberg

LEBENS LAUF

Sprachkenntnisse: Englisch
Latein
Französisch (Grundkenntnisse)

Mainz, 27.11.2007

Frank Gerlach

11 Veröffentlichungen

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

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

J Biol Chem. 2004; 279: 8063-9. Epub 2003 Dec 3.

Cytoglobin is a recently discovered vertebrate globin distantly related to myoglobin, and its function is unknown. Here we present the first detailed analysis of the distribution and expression of cytoglobin. Northern and Western blotting experiments show the presence of cytoglobin mRNA and protein in a broad range of tissues. Quantitative PCR demonstrates an up-regulation of Cytoglobin mRNA levels in rat heart and liver under hypoxic conditions (22 and 44 h of 9% oxygen). Immunofluorescence studies with three antibodies directed against different epitopes of the protein consistently show cytoglobin in connective tissue fibroblasts as well as in hepatic stellate cells. Cytoglobin is also present in chondroblasts and osteoblasts and shows a decreased level of expression upon differentiation to chondrocytes and osteocytes. Cytoglobin is located in the cytoplasm of these cell types. Evidence against an exclusively nuclear localization of cytoglobin, as recently proposed, is also provided by transfection assays with green fluorescent protein fusion constructs, which demonstrates the absence of an active nuclear import. The differential expression of cytoglobin argues against a general respiratory function of this molecule, but rather indicates a connective tissue-specific function. We hypothesize that cytoglobin may be involved in collagen synthesis. Cytoglobin expression was also observed in some neuronal subpopulations of the central and the peripheral nervous systems. Surprisingly, cytoglobin is localized in both the cytoplasm and nucleus of neurons, indicating a possible additional role of this protein in neuronal tissues.

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

Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, Roesner A, Schmidt M, Weich B, Wystub S, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Bolognesi M, De Sanctis D, Marden MC, Kiger L, Moens L, Dewilde S, Nevo E, Avivi A, Weber RE, Fago A, Burmester T.

J Inorg Biochem. 2005; 99: 110-9.

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

their oxygen affinities resemble that of myoglobin. While neuroglobin is evolutionarily related to the invertebrate nerve-globins, cytoglobin shares a more recent common ancestry with myoglobin. Neuroglobin expression is confined mainly to brain and a few other tissues, with the highest expression observed in the retina. Present evidence points to an important role of neuroglobin in neuronal oxygen homeostasis and hypoxia protection, though other functions are still conceivable. Cytoglobin is predominantly expressed in fibroblasts and related cell types, but also in distinct nerve cell populations. Much less is known about its function, although in fibroblasts it might be involved in collagen synthesis.

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

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

IUBMB Life. 2004; 56: 671-9.

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

Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution.

Burmester T, Haberkamp M, Mitz S, Roesner A, Schmidt M, Ebner B, Gerlach F, Fuchs C, Hankeln T.

IUBMB Life. 2004; 56: 703-7.

Hemoglobin and myoglobin are oxygen transport and storage proteins of most vertebrates. Neuroglobin (Ngb) and cytoglobin (Cygb)-two recent additions to the vertebrate globin superfamily-have still disputed functions. Combining the data from all available resources, we investigate the evolution of these novel globins. Both Ngb and Cygb show little sequence variation in vertebrate evolution, suggesting conserved structures and functions, and an important role in the animal's metabolism. Exon-intron patterns remained unchanged in Ngb

and Cygb, with the exception of the addition of a 3' exon to Cygb early in mammalian evolution. In phylogenetic analyses, Ngb forms a common branch with globin X, another recently identified globin with undefined function in lower vertebrates, and with some invertebrate nerve globins. This shows an early divergence of this branch in animal evolution. Cygb is related to myoglobin, and associated with an eye-specific globin from birds. The pattern of globin evolution shows that proteins with clear respiratory roles evolved independently from intracellular globins with uncertain functions. This result suggests either multiple independent functional changes or a yet undefined respiratory role of tissue globins like Ngb and Cygb.

Duplicated cytoglobin genes in teleost fishes.

Fuchs C, Luckhardt A, Gerlach F, Burmester T, Hankeln T.

Biochem Biophys Res Commun. 2005; 337: 216-23.

Cytoglobin is a recently discovered myoglobin-related O₂-binding protein of vertebrates with uncertain function. It occurs as single-copy gene in mammals. Here, we demonstrate the presence of two paralogous cytoglobin genes (Cygb-1 and Cygb-2) in the teleost fishes *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Tetraodon nigroviridis*, and *Takifugu rubripes*. The globin-typical introns at positions B12.2 and G7.0 are conserved in both genes, whereas the C-terminal exon found in mammalian cytoglobin is absent in the fish genes. Phylogenetic analyses show that the two cytoglobin genes diverged early in teleost evolution. This is confirmed by gene synteny analyses, which suggest a large-scale duplication event. Although both cytoglobin genes are highly conserved and have evolved under purifying selection, substitution rates are significantly higher in Cygb-1 than in Cygb-2. Similar to their mammalian ortholog, both fish cytoglobins are expressed in a broad range of tissues. However, Cygb-2 is more than 250-fold stronger expressed in neuronal tissues, suggesting a subfunctionalization of the two cytoglobin paralogs after gene duplication.

Genomic organization and molecular evolution of the genes for neuroglobin and cytoglobin in the hypoxia-tolerant Israeli mole rat, *Spalax carmeli*

Gerlach F, Avivi A, Joel A, Burmester T, Nevo E, Hankeln T.

Israel Journal of Ecology and Evolution 2006; 52: 389-403.

The genes for the two respiratory proteins neuroglobin (Ngb) and cytoglobin (Cygb) in the subterranean Israeli mole rat *Spalax carmeli* have been sequenced and compared to other mammals including human. Coding regions of both *Spalax* genes are highly conserved on the nucleotide and amino acid level. The ratios of non-synonymous to synonymous nucleotide substitutions suggest strong purifying selection acting on Ngb and Cygb in all mammals. Thus, there appears to be no special sequence level adaptation in the two respiratory proteins within the hypoxia-tolerant mole rat. On the genomic level, *Spalax* Ngb and Cygb gene

regions revealed the conserved 4-exon-3-intron structure and conserved CpG-rich islands in the 5' region. The *Spalax* *Cygb* gene promoter contains a conserved hypoxia-responsive transcription factor binding site, indicating a possible up-regulation of *Cygb* under oxygen deprivation. In *Cygb* intron 1, we observed a stretch of highly conserved putatively non-coding sequence of yet unknown (regulatory?) importance. In the *Spalax* *Ngb* gene, we note the presence of candidate hypoxia-responsive elements, which are not conserved in *Ngb* of hypoxia-sensitive mammals. Both globin gene regions harbor *Spalax*-specific simple sequence regions, which might be of adaptive value. We conclude that adaptations for hypoxia in mole rats are most likely to be found in regulatory functions rather than in protein structure.

Coping with cyclic oxygen availability: evolutionary aspects

Flück M, Webster KA, Graham J, Giomi F, Gerlach F, Schmitz A.

Integrative and Comparative Biology 2007; 47: 524-531.

Both the gradual rise in atmospheric oxygen over the Proterozoic Eon as well as episodic fluctuations in oxygen over several million-year time spans during the Phanerozoic Era, have arguably exerted strong selective forces on cellular and organismic respiratory specialization and evolution. The rise in atmospheric oxygen, some 2 billion years after the origin of life, dramatically altered cell biology and set the stage for the appearance of multicellular life forms in the Vendian (Ediacaran) Period of the Neoproterozoic Era. Over much of the Paleozoic, the level of oxygen in the atmosphere was near the present atmospheric level (21%). In the Late Paleozoic, however, there were extended times during which the level of atmospheric oxygen was either markedly lower or markedly higher than 21%. That these Paleozoic shifts in atmospheric oxygen affected the biota is suggested by the correlations between: (1) Reduced oxygen and the occurrences of extinctions, a lowered biodiversity and shifts in phyletic succession, and (2) During hyperoxia, the corresponding occurrence of phenomena such as arthropod gigantism, the origin of insect flight, and the evolution of vertebrate terrestriality. Basic similarities in features of adaptation to hypoxia, manifest in living organisms at levels ranging from genetic and cellular to physiological and behavioral, suggest the common and early origin of a suite of adaptive mechanisms responsive to fluctuations in ambient oxygen. Comparative integrative approaches addressing the molecular bases of phenotypic adjustments to cyclic oxygen fluctuation provide broad insight into the incremental steps leading to the early evolution of homeostatic respiratory mechanisms and to the specialization of organismic respiratory function.

Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia

Burmester T, Gerlach F, Hankeln T.

Adv. Exp. Med. Biol. 2007; 618; in press.

Neuroglobin (*Ngb*) and cytoglobin (*Cygb*) are two novel members of the globin superfamily that are ubiquitously present in vertebrates. Their exact physiological roles are still uncertain.

Here we review the expression of Ngb and Cygb, with particular emphasis on their regulation and potential role under hypoxia. Ngb expression is confined to neurons and some endocrine tissues. At the subcellular level, Ngb is associated with the presence of mitochondria and thus linked to the oxidative metabolism. Hypoxia or ischemic insults most likely do not strongly increase Ngb levels in the rodent brain. This might be explained by the fact that most mammals are not adapted to low oxygen levels. In zebrafish and turtle, however, which live in an environment with naturally changing oxygen conditions, hypoxia dramatically increases Ngb expression in the brains. We also found that hypoxia-tolerant species (*e.g.* the mole rat *Spalax* and goldfish) express more Ngb in their brains than their oxygen-deprivation sensitive relatives. These data suggest that Ngb may have a myoglobin-like role and supplies oxygen to the respiratory chain of the metabolically highly active neurons, or protect them from reactive oxygen species. Cygb is predominantly expressed in fibroblasts and related cell types, but also in distinct nerve cell populations. Cygb levels are significantly elevated at low oxygen levels in the fibroblast cell lineage. Cell culture data suggest that in fibroblasts Cygb is involved in cell proliferation, possibly in collagen synthesis. In neurons, there is evidence for an additional role of Cygb related to nitric oxide metabolism.

Oxygen-induced changes of hemoglobin expression in *Drosophila*

Gleixner E, Abriss D, Adryan B, Kraemer M, Gerlach F, Schuh R, Burmester T, Hankeln T.

In Vorbereitung

The hemoglobin gene 1 (*dmeglob1*) of the fruitfly *Drosophila melanogaster* is expressed in trachea and fat body, and has been implied to be involved in hypoxia-resistance of the fly. Here we investigate the expression levels of *dmeglob1* and lactate dehydrogenase, which served as a positive control, in embryos, 3rd instar larvae and adult flies, employing various regimes of hypoxia and hyperoxia. The mRNA of lactate dehydrogenase increased under hypoxia as expected. We show that expression levels of *dmeglob1* are lower under both short- and long-term hypoxia, as compared to the normoxia (21% O₂) control. In contrast, a hypoxia/reoxygenation regime applied to 3rd instar larvae elevated the *dmeglob1* mRNA level. Application of an excess of O₂ (hyperoxia) also triggered an increase of *dmeglob1* mRNA. These data suggest that *Drosophila* hemoglobin may be unlikely to function merely as a myoglobin-like O₂ storage protein. Rather, *dmeglob1* may protect the fly from an excess of O₂, either by buffering the flux of O₂ from the tracheoles to the cells or by degrading noxious reactive O₂ species.

12 Erklärung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben. Des weiteren versichere ich, dass ich diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung oder die gleiche oder Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht habe.

Mainz, 27.11.2007

Frank Gerlach