

Untersuchung von multiplen Globin-Genen in Strahlenflossern (Actinopterygii)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades „Doktor der Naturwissenschaften“

an der Fakultät für

Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kathrin Helfenrath

Hamburg, September 2019

Tag der Disputation: 15.11.2019

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

Prof. Dr. Susanne Dobler

Dr. Andrej Fabrizious

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Entstehung von Sauerstoff - Grundlage für die Entwicklung von Vertebraten.....	3
1.2 Respiratorische Proteine	4
1.3 Globine	5
1.3.1 Ursprung und Phylogenie der Globine.....	12
1.4 Entstehung von multiplen Genen	13
1.4.1 Das Schicksal duplizierter Gene.....	15
1.4.2 Multiple Globine in Vertebraten.....	16
1.5 Strahlenflosser (Actinopterygii)	19
1.5.1 Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>).....	21
1.5.2 Flösselhechtartige (Polypteriformes)	21
1.6 Zielsetzung	23
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Modellorganismen	25
2.1.1 Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>).....	25
2.1.2 Flösselhechtartige (Polypteriformes)	25
2.2 Stressversuche.....	25
2.2.1 Hypoxie-Stress	26
2.2.2 ROS-Stress.....	26
2.3 Material.....	26
2.3.1 Geräte.....	26
2.3.2 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und kommerzielle Kits	27
2.3.3 Enzyme	28
2.3.4 Vektoren	28
2.3.5 Primer.....	29
2.3.6 Antikörper.....	29
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.4.1 Isolierung von RNA	29
2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	30
2.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	30

2.4.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	31
2.4.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	32
2.4.6	Klonierung.....	32
2.4.7	Selektion positiver Bakterienklone.....	34
2.4.8	Dauerkulturen.....	35
2.4.9	Plasmidpräparation.....	35
2.4.10	Sequenzierung.....	35
2.4.11	Überprüfen der Klonierung mittels Restriktionsverdau	35
2.4.12	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren.....	36
2.4.13	<i>Quantitative Real Time</i> -Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	36
2.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	38
2.5.1	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	38
2.5.2	Herstellung der Sonde	38
2.5.3	Markierungseffizienztest mittels Dot-Blot	39
2.5.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung an Gewebeschnitten	40
2.5.5	<i>Whole mount in situ</i> -Hybridisierung.....	41
2.6	Generierung einer <i>Cygb1</i> -Knockoutmutante mittels CRISPR/Cas9	42
2.6.1	Guide-RNA	42
2.6.2	Injektion der CRISPR/Cas9-Komponenten	45
2.6.3	Genotypisierung der <i>Cygb1</i> -Knockoutmutanten	46
2.6.4	Etablierung einer stabilen <i>Cygb1</i> -Knockoutlinie	48
2.7	Transkriptomanalyse der <i>Cygb1</i> -Knockoutmutanten.....	49
2.7.1	QC Report	50
2.7.2	Trimming der Reads	50
2.7.3	Mapping.....	50
2.7.4	Hauptkomponentenanalyse.....	51
2.7.5	Differentiale Expressionsanalysen	51
2.7.6	Heatmap.....	52
2.7.7	Venn-Diagramm.....	52
2.7.8	Panther.....	52
2.8	Bioinformatische Methoden.....	53
2.8.1	Ermittlung der Globin-Sequenzen in diversen Strahlenflossern (Actinopterygii) .	53
2.8.2	Sequenzanalysen	54

2.8.3	Stammbaumanalysen.....	54
2.8.4	Genexpressionsanalyse mittels RNA-Seq	55
2.9	Proteinbiochemische Methoden	55
2.9.1	Immunhistochemie	55
2.9.2	Rekombinante Expression	56
2.9.3	Zellaufschluss nach der rekombinanten Expression	57
2.9.4	Aufreinigung von Proteinen via His60 Ni Säulchen	58
2.9.5	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	59
2.9.6	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	59
2.9.7	Coomassie-Färbung.....	61
2.9.8	Umpuffern von rekombinanten Proteinen	61
3	Ergebnisse.....	62
3.1	Dupliziertes <i>Cygb</i> -Gen in echten Knochenfischen (Teleostei)	62
3.1.1	Sequenzanalysen der duplizierten <i>Cygb</i> -Gene deuten auf divergierte <i>Cygb1</i> -Sequenzen und konservierte <i>Cygb2</i> -Sequenzen in Teleostei hin	62
3.1.2	Phylogenetische Untersuchungen der duplizierten <i>Cygb</i> -Gene zeigen eine schnellere evolutionäre Entwicklung von <i>Cygb1</i> auf	65
3.1.3	Genexpressionsanalysen in Teleostei zeigen ein diverses Expressionsmuster von <i>Cygb1</i> und ein konserviertes Expressionsmuster für <i>Cygb2</i> auf.....	67
3.2	Untersuchungen zur Lokalisation von <i>Cygb1</i> und <i>Cygb2</i> im Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>) ..	69
3.2.1	Lokalisation von <i>Cygb1</i> und <i>Cygb2</i> im Gehirn vom Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>).....	69
3.2.2	Lokalisation von <i>Cygb1</i> und <i>Cygb2</i> in der Leber von <i>Danio rerio</i>	73
3.2.3	mRNA-Lokalisation von <i>Cygb1</i> und <i>Cygb2</i> in <i>Danio rerio</i> Embryonen.....	75
3.3	Funktionsuntersuchung von <i>Cygb1</i> und <i>Cygb2</i> mittels verschiedener Stressversuche	77
3.3.1	Genexpression von <i>Cygb1</i> und <i>Cygb2</i> unter Hypoxie-Bedingungen.....	78
3.3.2	Genexpression von <i>Cygb1</i> und <i>Cygb2</i> unter ROS-Stress-Bedingungen	80
3.4	Generierung und Untersuchung einer <i>Cygb1</i> -Knockoutmutante.....	83
3.4.1	Generierung der <i>Cygb1</i> -Knockoutmutante mittels CRISPR/Cas9	83
3.4.2	Phänotypische Untersuchungen der <i>Cygb1</i> -Knockoutmutante zeigen keine Abnormitäten auf.....	90
3.4.3	Analyse der Gehirn- und Leber-Transkriptome der <i>Cygb1</i> -Knockoutmutante	92
3.5	Multiple Myoglobin-Gene in Flösselhechtartigen (Polypteriformes).....	107
3.5.1	Phylogenie der multiplen Mb-Gene	108
3.5.2	Multiple Mb-Gene im Senegal-Flösselhecht (<i>Polypterus senegalus</i>).....	110

3.5.3	Multiple Mb-Gene im Flösselaal (<i>Erpetoichthys calabaricus</i>).....	114
4	Diskussion.....	119
4.1	Evolution der duplizierten <i>Cygb</i> -Gene in echten Knochenfischen (Teleostei).....	120
4.2	Funktion der duplizierten <i>Cygb</i> -Gene während der Entwicklung des Zebrafisches....	124
4.3	Funktionshypothesen zu den duplizierten <i>Cygb</i> -Genen im Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>) ..	125
4.3.1	<i>Cygb1</i> fungiert im Zebrafisch als Sauerstoffversorger- und antioxidatives Protein 125	
4.3.2	Transkriptomanalysen der <i>Cygb1</i> -Knockoutmutanten	127
4.3.3	Funktionsanalysen von <i>Cygb2</i> anhand der Stressversuche deuten auf antioxidative Funktionen hin	135
4.3.4	Die erzielten Ergebnisse deuten auf eine Subneofunktionalisierung von <i>Cygb1</i> und <i>Cygb2</i> hin.....	136
4.4	Multiple Mb-Gene	139
4.4.1	Entwicklung von multiplen Mb-Genen in Fischen	139
4.4.2	Gründe für die Entstehung von multiplen Mb-Genen	141
4.4.3	Das evolutionäre Schicksal der multiplen Mb-Gene.....	145
5	Ausblick.....	146
6	Literaturverzeichnis	148
	Abkürzungsverzeichnis.....	158
	Anhang.....	160
	Eidesstattliche Erklärung	164
	Danksagung.....	165

Zusammenfassung

Die Entwicklung von neuen Genen durch Gen- oder Genomduplikationen ist Ursprung von evolutionären Neuheiten und stellt somit die treibende Kraft der Evolution dar (Ohno 1970; Gu et al. 2003; Pichersky und Gang 2000; Ober 2005; Roth et al. 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden (A) die duplizierten Cytoglobin-Gene (*Cygb1* und *Cygb2*) in Teleostei (echte Knochenfische) und (B) die multiple Myoglobin-Gene (Mb) in Polypteriformes (Flösselhechtartigen) untersucht.

(A) Um ein besseres Verständnis für die Evolution und funktionelle Entwicklung des duplizierten *Cygb*-Gens zu erhalten, wurden die Aminosäuresequenzen, die Phylogenie sowie die Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* in diversen Teleostei untersucht. Darüber hinaus wurden Lokalisationsuntersuchungen sowie Funktionsuntersuchungen von *Cygb1* und *Cygb2* in Zebrafischen durchgeführt. Die Untersuchungen der duplizierten *Cygb*-Gene in diversen Teleostei ergaben, dass *Cygb1* im Vergleich zu *Cygb2* über ein sehr variables Genexpressionsmuster verfügt sowie höhere Sequenzdivergenzen und höhere Substitutionsraten aufweist. Die Lokalisationsuntersuchungen ergaben, dass beide duplizierten *Cygb*-Gene in Neuronen (*Cygb1* verstärkt in Spinal-Neuronen und *Cygb2* verstärkt in Intestinal-Neuronen) und Hepatozyten vorkommen. *Cygb1* ist darüber hinaus noch in Blutgefäßen lokalisiert. Die Funktionsuntersuchungen, die anhand von verschiedenen Stressversuchen durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass *Cygb1* als Sauerstoffspeicher- und/oder als Sauerstofftransportprotein fungiert und *Cygb2* an der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist. Die Funktionen von *Cygb1* konnten unter Verwendung eigens generierter *Cygb1*-Knockoutmutanten genauer untersucht werden. Hierfür wurden die Leber- und Gehirn-Transkriptome der *Cygb1*-Knockoutmutanten im Vergleich zu *Cygb1*-Wildtyp-Transkriptomen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen untersucht. Die Analyse der Transkriptome ergab, dass *Cygb1* als Sauerstoffspeicher- und/oder als Sauerstofftransportprotein fungiert, an der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist, in die Biosynthese und/oder den Transport von Cholesterin und weiteren Lipiden involviert ist und Sauerstoff für die NO-Synthase bereit stellt. Die Arbeiten aus vorherigen Studien (Fuchs et al. 2005; Roesner et al. 2006; Corti et al. 2016a) deuten in Verbindung mit den hier erzielten Ergebnissen darauf hin, dass sich die duplizierten *Cygb*-Gene vermutlich subneofunktionalisiert haben. Hierbei hätten die duplizierten *Cygb*-Gene Funktionen des Vorläufer *Cygb*s aufgeteilt und würden diese weiterhin ausführen. Zusätzlich hat *Cygb1* eine

weitere, neue Funktion entwickelt, bei der es sich wahrscheinlich um eine Sauerstoffspeicher- und/oder Sauerstofftransport-Funktion handelt. Für das *single copy* *Cygb* der Tetrapoden scheint eine Funktion im oxidativen Metabolismus nahezu ausgeschlossen, da keine Korrelation zwischen der *Cygb*-Expression und dem Sauerstoffverbrauch besteht (Hankeln et al. 2005; Schmidt et al. 2005). Darüber hinaus weist *Cygb1*, im Gegensatz zum *single copy* *Cygb*, eine Lokalisation in Blutgefäßen auf, was ebenfalls für eine Subneofunktionalisierung spricht.

(B) Während die meisten Vertebraten nur ein *single copy* Mb besitzen, weisen einige Fische multiple Mb-Gene auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten sowohl im Senegal-Flösselhecht (*Polypterus senegalus*) als auch im Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*) 15 multiple Mb-Gene identifiziert werden. Um die evolutionäre und funktionelle Entwicklung der multiplen Mb-Gene zu untersuchen, wurden die Aminosäuresequenzen, die Phylogenie sowie die Genexpressionsmuster untersucht. Die Analyse der Aminosäuresequenzen zeigt, dass innerhalb der multiplen Mb-Gene hohe Sequenzdivergenzen vorliegen und im Senegal-Flösselhecht vier der 15 Mb-Gene Pseudogene sind. Es liegt also eine Expansion der Mb-Gene durch Amplifikation im Flösselaal und eine Reduktion durch Pseudogenisierung im Flösselhecht vor. Die durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen zeigen, dass die multiplen Mb-Gene der Flösselhechtartigen im letzten gemeinsamen Vorfahren entstanden sind und unterschiedliche Substitutionsraten aufzeigen. Die Genexpressionsmuster der multiplen Mb-Gene im Senegal-Flösselhecht und im Flösselaal unterscheiden sich voneinander. Nahezu alle multiplen Mb-Gene des Senegal-Flösselhechts werden im Gehirn exprimiert und kommen in den restlichen Geweben nur vereinzelt vor. Die Genexpression der multiplen Mb-Gene im Flösselaal zeigen ein eher ubiquitäres Muster auf, wobei die stärksten Expressionen in der Lunge und im Herzen vorliegen. Die durchgeführten Analysen der multiplen Mb-Gene lassen, im Hinblick auf das evolutionäre Schicksal, vermuten, dass die Mb-Gene im Gehirn des Senegal-Flösselhechts möglicherweise eine Funktionsverstärkung (additiven Effekt) ausüben. Die hohen Sequenzdivergenzen, die unterschiedlichen Substitutionsraten sowie die verschiedenen Hauptexpressionsorte deuten jedoch eher darauf hin, dass die multiplen Mb-Gene in Flösselhechtartigen unterschiedliche Funktionen ausüben.

1 Einleitung

1.1 Entstehung von Sauerstoff - Grundlage für die Entwicklung von Vertebraten

Vor circa zweieinhalb Milliarden Jahren entwickelten Vorläufer der heutigen Cyanobakterien die Fähigkeit, aus Sonnenlicht, Wasser und Kohlenstoffdioxid Sauerstoff (O₂) und Zucker zu produzieren: Die Photosynthese war geboren (Rasmussen et al. 2008; Bekker et al. 2004; Purves et al. 2011). Sauerstoff war für die meisten lebenden Organismen giftig, begünstigte aber die Vermehrung der Organismen erheblich, die eine Toleranz dem O₂ gegenüber entwickelten. Da ein aerober Stoffwechsel energetisch wesentlich günstiger ist als ein anaerober Stoffwechsel (Decker und van Holde 2011), war es diesen Organismen möglich, verschiedene ökologische Nischen zu besiedeln (Purves et al. 2011). Der aerobe Stoffwechsel begünstigte das Wachstum und die Entstehung einer hohen Diversität. In diesem Zusammenhang entwickelten sich vor circa 450-500 Millionen Jahren auch erste Vertebraten (Abb. 1).

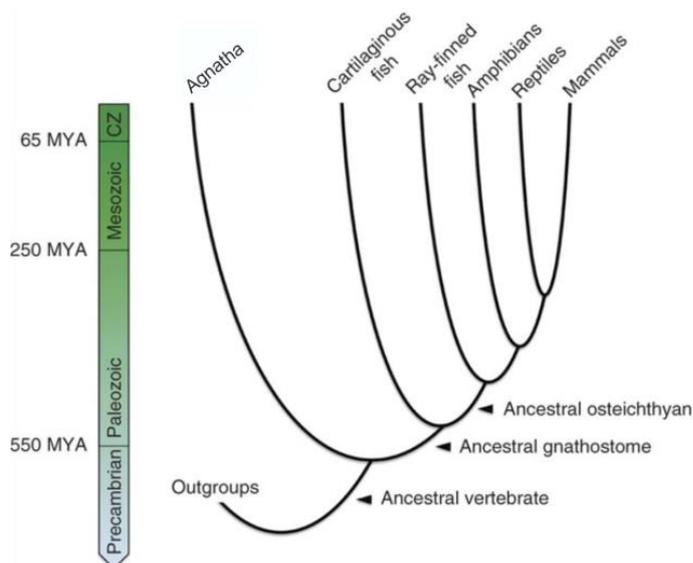


Abbildung 1 Phylogenie der Vertebraten und ihre Radiation in sechs Klassen

Dargestellt ist die Entstehung der Vertebrata-Klassen (*Agnatha* - Kieferlose, *Cartilaginous fish* - Knorpelfische, *Ray-finned fish* - Strahlenflosser, *Amphibians* - Amphibien, *Reptiles* - Reptilien, *Mammals* - Säugetiere) innerhalb der letzten 550 Millionen Jahre (MYA- million years ago). CZ – Cenozoic, Känozoikum. Bearbeitet nach (Smith et al. 2013).

Zunächst entstand vor ungefähr 500 Millionen Jahren, aus dem letzten gemeinsamen Vorfahren der Wirbeltiere, die Wirbeltierlinie der Kieferlosen (*Agnatha*). Schließlich entstanden die Knorpelfische, die Strahlenflosser, die Amphibien, die Reptilien und die Säugetiere (Smith et al. 2013). Bei der zunehmenden Körpergröße und Komplexität der Organismen reichte eine

passive O₂-Diffusion nicht mehr aus, um den Organismus ausreichend mit O₂ zu versorgen, wodurch im Laufe der Evolution Gefäßsysteme entstanden sind. Innerhalb dieser Gefäßsysteme binden respiratorische Proteine (1.2) O₂ und transportieren diesen zu stoffwechselaktiven Organen.

1.2 Respiratorische Proteine

Eine ausreichende O₂-Versorgung, zum oxidativen Abbau von organischen Stoffen und zur Energiegewinnung in Form von Adenosintriphosphat, ist in komplexen Organismen unabdingbar. Die O₂-Versorgung wird durch respiratorische Proteine gewährleistet, die O₂ an respiratorischen Oberflächen, wie Lungen oder Kiemen, reversibel binden und zu metabolisch aktiven Organen transportieren. Sie erhöhen die O₂-Konzentration in Flüssigkeiten, wie Blut, von rein physikalisch gelösten 0,3 Volumenprozent auf 20 Volumenprozent. Im Laufe der Evolution konnten sich drei Klassen von respiratorischen Proteinen etablieren: Hämerythrine, Hämocyanine und Globine (Mangum 1985; Terwilliger 1998; Burmester 2002). **Hämerythrine** kommen in marinen Invertebraten, den Sipunculiden, Priapuliden, Brachiopoden und mehreren Anneliden vor (Mangum 1992). Mit Hilfe zweier zweiwertiger Eisen-Ionen (Fe²⁺) ist Hämerythrin in der Lage, Sauerstoff reversibel zu binden. Hämerythrin ist intrazellulär lokalisiert und sorgt im oxygenierten Zustand für eine violette Färbung der entsprechenden Flüssigkeit. **Hämocyanine** sind extrazellulär in der Hämolymphe von Arthropoden und Mollusken lokalisiert (Markl und Decker 1992; Terwilliger 1998; Burmester 2002). Mittels zweier Kupfer-Ionen (CuA und CuB), die durch je drei Histidin-Reste koordiniert werden, binden Hämocyanine O₂ reversibel. Im oxygenierten Zustand färbt sich das Blut blau, im desoxygenierten Zustand liegt es farblos vor. Aufgrund von unterschiedlicher Struktur und fehlender Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz wird von einer konvergenten Entwicklung der Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine ausgegangen (Burmester 2002). **Globine** sind die am weitesten verbreitete Familie der respiratorischen Proteine in Archaeen, Bakterien und Eukaryoten (Vinogradov et al. 2006). In Mollusken und Arthropoden liegen Globine extrazellulär in der Hämolymphe vor, ansonsten sind sie intrazellulär in Geweben und Erythrozyten lokalisiert (Hardison 1996; Terwilliger 1998; Weber und Vinogradov 2001; Burmester und Hankeln 2007).

1.3 Globine

Globine sind kleine respiratorische Atmungsproteine, die in der Lage sind, gasförmige Liganden, wie Sauerstoff, reversibel zu binden (Kendrew et al. 1958; Storz et al. 2013). Sie spielen eine essentielle Rolle im oxidativen Energie-Metabolismus und sind darüber hinaus an der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie an dem Auf- und Abbau von Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt (Burmester und Hankeln 2014). Globine bestehen meist aus ungefähr 150 Aminosäuren, wobei es bei einigen Vertretern zu N- und/oder C-terminalen Verlängerungen kam (Hankeln et al. 2005; Burmester und Hankeln 2014). In der Sekundärstruktur falten sich die Aminosäuren zu acht rechtgängigen α -Helices (Helix A-H), die in der Tertiärstruktur eine „drei-über-drei Sandwichstruktur“ bilden, in deren hydrophober Tasche die Hämgruppe lokalisiert ist (Abb. 2) (Dickerson 1983; Holm und Sander 1993). Diese Hämgruppe, die aus einem Protoporphyrinring mit einem zentralen Fe^{2+} Ion besteht, bildet das Sauerstoffbindezentrum von Globinen. Das Fe^{2+} Ion ist an vier von sechs Bindestellen an Stickstoffatome des Protoporphyrinrings gebunden. Die fünfte Bindestelle, die genauso wie die sechste senkrecht zur Hämgruppe liegt, wird proximal vom Histidin F8 besetzt. Die sechste Bindestelle ist bei pentakoordinierten Globinen im Deoxyzustand frei (Abb. 2A, 2C), wobei sie bei hexakoordinierten Globinen eine Bindung mit dem Histidin an Position E7 eingeht (Abb. 2B, 2C) (Pesce et al. 2002). Das Histidin E7 wird reversibel durch Sauerstoff verdrängt, wobei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Dissoziation vom Histidin E7 ist (Dewilde et al. 2001; Pesca et al. 2002). Die ursprüngliche Form stellt in der Vertebraten-Evolution wohl die Hexakoordinierung dar (Brunori und Vallone 2007; Kakar et al. 2010). Bei hexakoordinierten Globinen kommt es bei der Verdrängung des distalen Histidins durch einen Liganden zu einer Konformationsänderung, was auf eine Beteiligung an Signaltransduktion hindeuten könnte (Hankeln et al. 2005).

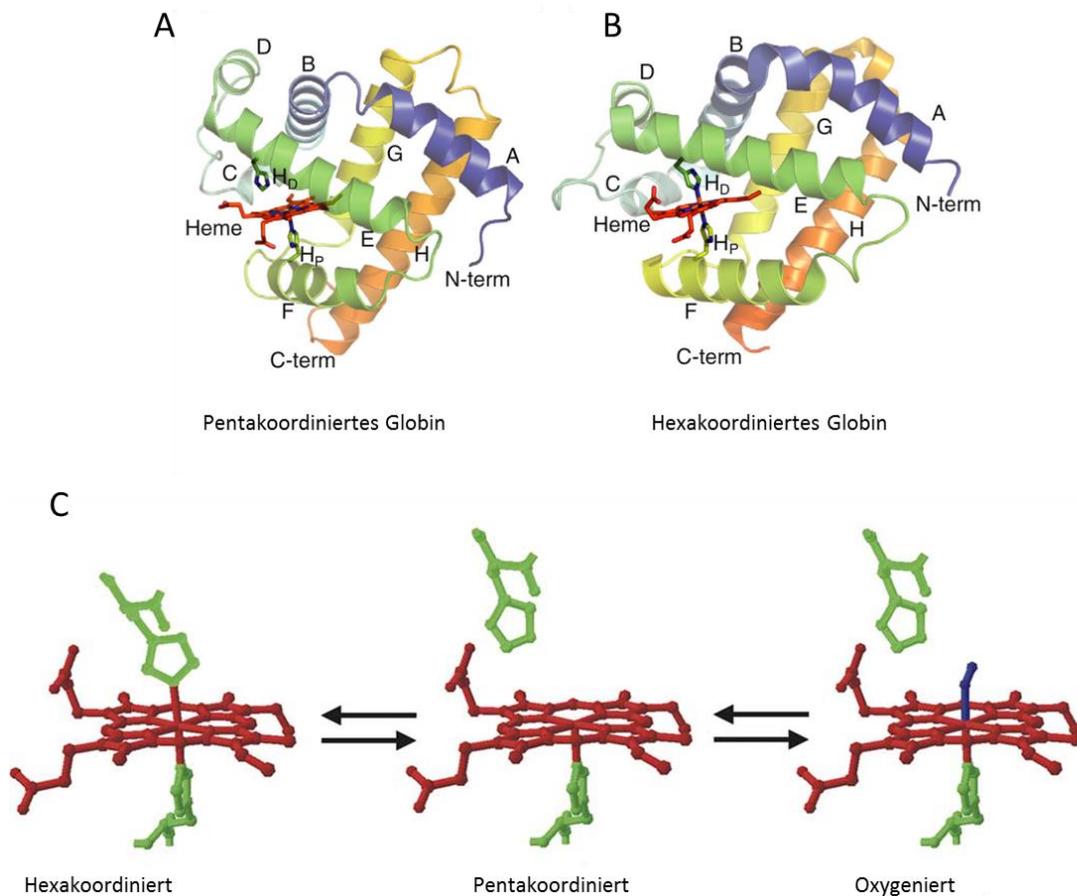


Abbildung 2 Dreidimensionale Struktur von hexa- und pentakoordinierten Globinen

Dargestellt ist die typische Globin „3-über-3- α helikale Sandwichstruktur“, die sich aus acht α -Helices (üblicherweise bezeichnet als Helix A-H) zusammensetzt. **A.** Dargestellt ist die Struktur des pentakoordinierten Pottwal-Myoglobins im deoxygenierten Zustand. Das Fe^{2+} -Ion wird durch das proximale Histidin (H_p) koordiniert, wobei die sechste, die distale, Bindestelle frei bleibt. **B.** Dargestellt ist die Struktur des hexakoordinierten Mäuse-Neuroglobins im deoxygenierten Zustand. Das Fe^{2+} Ion wird durch das proximale Histidin (H_p) und distale Histidin (H_d) koordiniert. **C)** Dargestellt ist eine schematische Übersicht eines hexakoordinierten, pentakoordinierten und oxygenierten Fe^{2+} Ions. Rot: Häm-Gruppe, Grün: proximales und distales Histidin, Blau: Sauerstoff (Kakar et al. 2010; Hankeln et al. 2005).

Zurzeit sind acht Vertreter der Globin-Superfamilie in Vertebraten bekannt (Abb. 3): Hämoglobin (Dickerson 1983), Myoglobin (Wittenberg und Wittenberg 1989), Neuroglobin (Burmester et al. 2000), Cytoglobin (Kawada et al. 2001; Burmester et al. 2002; Trent und Hargrove 2002), Globin E (Kugelstadt et al. 2004), Globin X (Roesner et al. 2005), Globin Y (Fuchs et al. 2006) und Androglobin (Hoogewijs et al. 2012). Trotz einer sehr hohen Divergenz auf der Aminosäureebene ist die Tertiärstruktur (3-über-3 α -helikale Sandwichstruktur) stark konserviert. Dennoch unterscheiden sich die Globin-Typen durch beispielsweise N- und/oder C-terminale Verlängerungen oder durch unterschiedliche Koordinierungen voneinander.

Außerdem weisen die verschiedenen Globin-Typen unterschiedliche zelluläre Lokalisationen auf und übernehmen unterschiedliche Funktionen (Pesce et al. 2002) (Abb. 3).

Hämoglobin (Hb) ist das am weitesten verbreitete Atmungsprotein im Tierreich und konnte in fast allen Vertebraten und in einigen Invertebraten nachgewiesen werden (Hardison 1996). Lediglich in einigen antarktischen Eisfisch-Spezies kam es zum Verlust des Hb-Gens (Sidell und O'Brien 2006). Das native Hb ist ein Heterotetramer und besteht aus zwei α - und zwei β -Proteinketten. Es ist in Erythrozyten lokalisiert und transportiert O_2 von respiratorischen Oberflächen, wie Lungen, Kiemen und der Haut, zu inneren Organen und transportiert CO_2 , welches bei der Zellatmung entsteht, ab (Dickerson 1983). Die Sauerstoffaffinität von $P_{50}=26$ Torr (Abb. 3) ermöglicht Hb die Aufnahme von Sauerstoff in Geweben mit hohem Sauerstoffpartialdruck, wie an respiratorischen Oberflächen, und die Abgabe von Sauerstoff in Geweben mit geringerem Sauerstoffpartialdruck.

Myoglobin (Mb) ist ein pentakoordiniertes, monomeres Protein, welches hauptsächlich in der Skelett- und Herzmuskulatur lokalisiert ist (Wittenberg 2003), aber auch in geringen Mengen in der glatten Muskulatur, Endothel- und Tumorzellen vorkommt (Qiu et al. 1998; Cossins et al. 2009; Gorr et al. 2011). Die hohe Sauerstoffaffinität von $P_{50}=1$ Torr (Abb. 3) befähigt Mb dazu, O_2 von Hb zu übernehmen (Burmester und Hankeln 2014) und in den Zellen zu den Mitochondrien zu transportieren (Wittenberg und Wittenberg 1989; Wittenberg 2003), wo O_2 als terminaler Elektronenakzeptor dient. Kommt es in der Muskulatur zu schwankenden Sauerstoffkonzentrationen, kann Mb O_2 je nach Bedarf binden oder freisetzen. Sauerstoffmangelbedingungen (Hypoxie) führen zu einer erhöhten Lactat-Ausschüttung, wodurch die Sauerstoffaffinität von Mb herabgesetzt wird und die Sauerstoffabgabe erleichtert wird (Mancini und Ramanathan 2008). In Muskelgeweben von tieftauchenden Säugern kommt es zu hohen Mb-Konzentrationen, um längere Tauchgänge durchführen zu können (Burmester und Hankeln 2014). Die Mb-Konzentration steigt hierbei proportional zu der Tauchkapazität an (Kooyman und Ponganis 1998). Des Weiteren weist das oxygenierte Mb (oxyMb) eine Dioxygenase-Aktivität auf, bei der oxyMb zu metMb oxidiert wird und das toxische NO unter Verwendung von O_2 zu Nitrat (NO_3) umgesetzt wird ($oxyMb(Fe^{2+})O_2 + NO \rightarrow MetMb(Fe^{3+}) + NO_3$) (Flogel et al. 2001). Unter Hypoxie-Bedingungen fungiert das deoxygenierte Mb (deoxyMb) als Nitratreduktase, wobei Nitrit (NO_2) zu NO umgewandelt wird ($NO_2 + deoxyMb(Fe^{2+}) + H^+ \rightarrow MetMb(Fe^{3+}) + NO$) (Hendgen-Cotta et al. 2008), was unter anderem zur Vasodilatation führen kann (Burmester und Hankeln 2014). Mb-Knockout-Mäuse

(Garry et al. 1998; Gödecke et al. 1999) zeigen keine direkten physiologischen Defekte, aber kompensieren den Mb-Verlust durch unterschiedliche Mechanismen. Zu den kompensatorischen Effekten zählen unter anderem eine höhere Kapillardichte und ein gesteigerter Hämatokritwert (Gödecke et al. 1999; Garry et al. 1998; Meeson et al. 2001). Vor einigen Jahren konnte Mb in Verbindung mit Krebserkrankungen gebracht werden. In diesem Zusammenhang wird die Expression von Mb in Tumorzellen von z.B. Brust-, Darm- und Prostatakrebs hochreguliert (Flonta et al. 2009; Gorr et al. 2011; Kristiansen et al. 2011). Abhängig von den Muskelzellen unterscheidet sich das Genexpressionsmuster von Mb und weist eine hohe Komplexität auf (Bicker et al. 2014). Die biologische Funktion von Mb im Zusammenhang mit Krebserkrankungen ist allerdings zum jetzigen Zeitpunkt unklar (Burmester und Hankeln 2014). Die meisten Vertebraten besitzen ein Mb-Gen. Eine Ausnahme bilden hier einige Karpfenartige, in denen ein dupliziertes Mb-Gen (Mb1 und Mb2) nachgewiesen werden konnte (Fraser et al. 2006; Roesner et al. 2008). Außerdem konnten im Westafrikanischen Lungenfisch (*Protopterus annectens*) sieben verschiedene Mb-Kopien (Koch et al. 2016) und im Froschwels (*Clarias batrachus*) 15 verschiedene Mb-Kopien identifiziert werden (1.4.2.2).

Cytoglobin (Cygb) wurde 2001/2002 in drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben und wurde aufgrund seiner zunächst ubiquitär erscheinenden Expression `Cyto`-Globin [griechisch - „Zelle“] genannt (Kawada et al. 2001; Burmester et al. 2002; Trent und Hargrove 2002). Cygb kommt in Fibroblasten und fibroblasten-ähnlichen Zellen sowie in Chondroblasten und Osteoblasten vor (Nakatani et al. 2004; Schmidt et al. 2004). Darüber hinaus konnte Cygb in Subpopulationen des zentralen und peripheren Nervensystems detektiert werden (Schmidt et al. 2004; Hankeln et al. 2004). In geringen Mengen kommt Cygb in Epithel- und Muskelzellen, Makrophagen, sowie Tumorzellen vor (Oleksiewicz et al. 2011; Oleksiewicz et al. 2013). Cygb konnte bisher in allen untersuchten Vertebraten, einschließlich des Neuauges (*Petromyzontiformes*), identifiziert werden (Burmester und Hankeln 2014; Schwarze et al. 2014). Eine Ausnahme bildet der Westafrikanische Lungenfisch (*Protopterus annectens*), der weder ein Cygb- noch ein Neuroglobin-Gen aufweist (Koch et al. 2016). Obwohl die meisten Vertebraten nur ein Cygb-Gen besitzen, konnten in echten Knochenfischen (Teleostei) zwei paraloge Cygb-Gene identifiziert werden (Fuchs et al. 2005) (1.4.2.1). Es besteht keine Korrelation zwischen der Cygb-Expression und dem Sauerstoffverbrauch, was gegen eine Funktion im oxidativen Metabolismus spricht (Hankeln et al. 2005; Schmidt et al. 2005).

Möglich wäre, dass Cygb an der Kollagen-Synthese beteiligt ist und in diesem Zusammenhang O_2 für die Prolyl-4-Hydroxylase bereitstellt, welche die Hydroxylierung von Prolinresten katalysiert und so die Kollagenketten-Tripelhelix stabilisiert (Schmidt et al. 2004). Eine Kollokalisierung von Cygb und neuronalen NO-Synthasen (nNOS) (Avivi et al. 2010; Hundahl et al. 2013) deutet auf eine Beteiligung von Cygb am Stickstoffmonoxid-Metabolismus hin (Burmester und Hankeln 2014). Ferner könnte Cygb an der Signaltransduktion (Reeder et al. 2011) oder an der Protektion vor ROS (Fang et al. 2011; Singh et al. 2014; Xu et al. 2006; Li et al. 2007b; Hodges et al. 2008) beteiligt sein. Darüber hinaus konnte eine Assoziation zwischen Cygb und Krebserkrankungen hergestellt werden. Hierbei agiert Cygb entweder als Tumorsuppressor (Oleksiewicz et al. 2011; Shivapurkar et al. 2008; Thuy Le et al. 2016a; Oleksiewicz et al. 2013) oder als Onkogen (Oleksiewicz et al. 2013). Die Expression von Cygb wird in Tumorzellen von Speiseröhrenkrebs oder Lungenkrebs mittels Hypermethylierung des Promotors runterreguliert (McRonald et al. 2006; Xinarianos et al. 2006). Unter Tumorphoxie wird die Expression von Cygb in Kopf- und Halskrebs hochreguliert (Shaw et al. 2009). In Cygb-Knockout-Mäusen konnte eine deutlich erhöhte Tumorgenese beobachtet werden (Thuy le et al. 2011). Zusätzlich zeigen die Cygb-Knockout-Mäuse multiple Organanomalien, wie Herzhypertrophie, auf (Thuy le et al. 2016b).

Neuroglobin (Ngb) zählt zu den phylogenetisch ältesten Globinen (Abb. 3) und wird hauptsächlich in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in endokrinen Geweben exprimiert (Burmester et al. 2000; Burmester und Hankeln 2009). Die Stärke der Expression von Ngb im Säugetier-Gehirn ist abhängig von der Region, wobei die höchste Expression im Hypothalamus gemessen wurde, gefolgt von der Expression im Hippocampus, der Großhirnrinde und dem Kleinhirn (Fabrizius et al. 2016). Ngb kommt in fast allen Vertebraten vor, außer in Kieferlosen (Agnatha), Knorpelfischen (Chondrichthyes) (Schwarze et al. 2014; Opazo et al. 2015; Burmester und Hankeln 2014) und im Westafrikanischen Lungenfisch (Koch et al. 2016). Die tatsächliche Funktion von Ngb ist noch unklar (Hankeln et al. 2005; Burmester und Hankeln 2009), wobei die sehr langsame Substitutionsrate (etwa 3-mal langsamer als bei Mb und Hb) auf eine wichtige und konservierte Funktion hindeutet (Wystub et al. 2004). Eine Assoziation von Ngb und Mitochondrien (Bentmann et al. 2005; Mitz et al. 2009) lässt eine Funktion als O_2 -Speicher und O_2 -Transportprotein vermuten. Des Weiteren wurde eine positive Korrelation von Ngb und der Hypoxie-Toleranz beschrieben (Roesner et al. 2008; Avivi et al. 2010; Schneuer et al. 2012). Es wäre möglich, dass Ngb in diesem

Zusammenhang als neuroprotektives Protein fungiert (Sun et al. 2001; Khan et al. 2006; Greenberg et al. 2008; Raida et al. 2013). Ngb könnte auch, ähnlich wie Mb, toxisches NO unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) zu NO₃ umwandeln oder während einer hypoxischen Periode als Nitritreduktase fungieren und NO₂ zu NO umsetzen (Brunori et al. 2005; Tiso et al. 2011). Ferner wäre es möglich, dass Ngb an der Detoxifizierung von ROS beteiligt ist (Herold et al. 2004).

Globin X (GbX) ist ein hexakoordiniertes Globin (Corti et al. 2016b) mit einer Länge von ~200 Aminosäuren. Damit ist GbX größer als die meisten Globine, was auf eine C- und N-Terminale Verlängerung zurückzuführen ist (Roesner et al. 2005). Am N-Terminus weist GbX Myristoylierung und Palmitoylierungsstellen an Gly2 und Cys3 auf, wodurch GbX mit der Membran assoziiert ist (Blank et al. 2011b). GbX kommt in Neunaugen, Haien, Strahlenflossern, Quastenflossern, Amphibien und einigen Reptilien vor, wohingegen es in Vögeln und Säugetieren verloren gegangen ist (Roesner et al. 2005; Fuchs et al. 2006; Blank und Burmester 2012; Schwarze und Burmester 2013; Opazo et al. 2015; Schwarze et al. 2015). GbX wird im Zebrafisch am stärksten in Ovarien und Testis exprimiert (unpublizierte Daten). Die Lokalisation von GbX an der Zellmembran deutet darauf hin, dass GbX Lipide der Membranen vor oxidativem Stress schützt oder es an Signalwegen beteiligt ist (Blank et al. 2011b; Blank und Burmester 2012). Der Schutz vor ROS durch GbX konnte *in vitro* bestätigt werden (Koch und Burmester 2016).

Globin Y (GbY) wurde zunächst im Krallenfrosch (*Xenopus*) identifiziert (Fuchs et al. 2006) und konnte darüber hinaus im Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*), der streifenköpfigen Bartagame (*Pogona vitticeps*), dem Rotkehlanolis (*Anolis carolinensis*), der Australischen Pflugnasenchimäre (*Callorhynchus milii*), im Quastenflosser (*Latimeria chalumnae*), in der Chinesischen Weichschildkröte (*Pelodiscus sinensis*), in der Zierschildkröte (*Chrysemys picta bellii*), in Krokodilen (*Crocodylia*), in Störartigen (*Acipenseriformes*) und Knochenganoiden (*Holostei*) nachgewiesen werden (Patel et al. 2008; Hoffmann et al. 2010b; Patel et al. 2010; Hoffmann et al. 2011; Schwarze und Burmester 2013; Schwarze et al. 2015; Gallagher und Macqueen 2017). Im Vergleich zu den anderen Globinen weist GbY eine recht geringe Expression auf, wobei die höchsten Expressionen in den Nieren, der Lunge, den Augen und den Ovarien detektiert wurden (Fuchs et al. 2006; Schwarze et al. 2015). Die Funktion und die phylogenetische Position von GbY ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar (Burmester und Hankeln

2014). Syntenie-Untersuchungen zeigen jedoch eine phylogenetische Verbindung von GbY zu Hb auf (Schwarze und Burmester 2013; Schwarze et al. 2015).

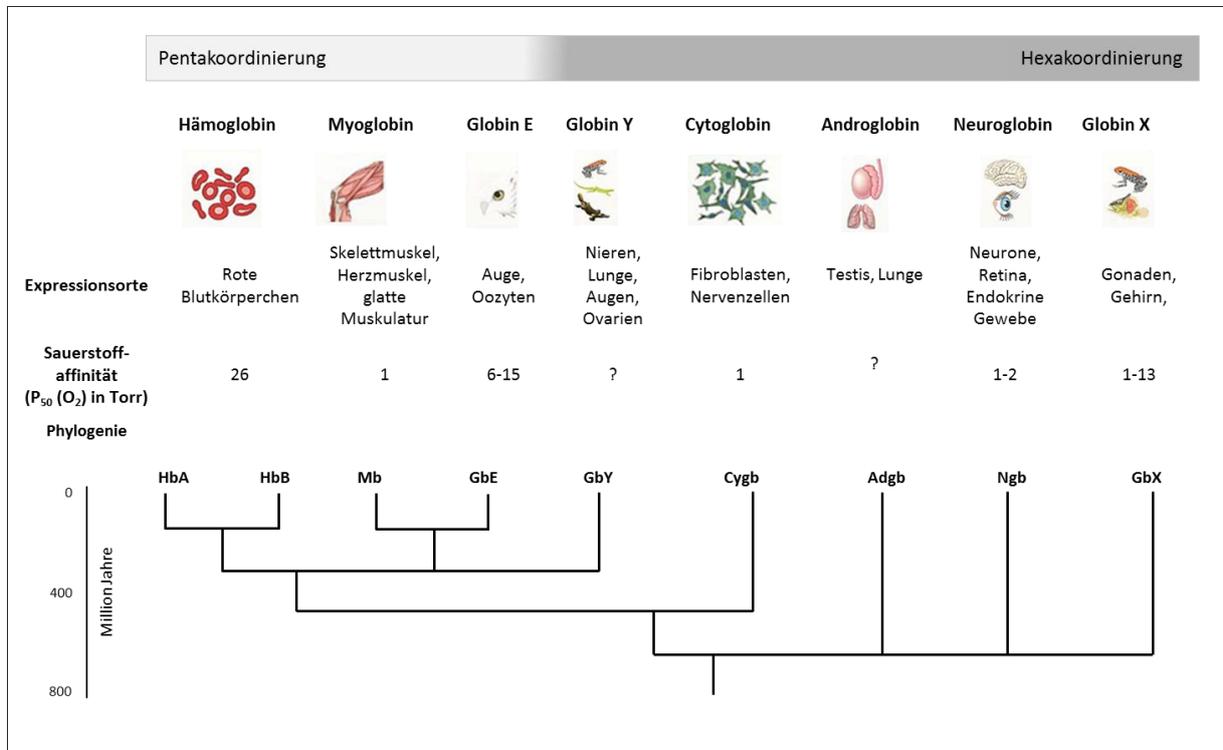


Abbildung 3 Übersicht der acht Vertebraten-Globine

Dargestellt ist der Expressionsort, die Fe²⁺-Atom Koordination, die Sauerstoffaffinität und die Phylogenie der acht Vertebraten-Globine. Verändert und erweitert nach (Hankeln et al. 2005; Hoffmann et al. 2010b; Blank und Burmester 2012; Hoogewijs et al. 2012; Laufs 2010; Ebner 2012; Fabrizius 2014).

Globin E (Gb E) wurde 2004 erstmals im Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) beschrieben (Kugelstadt et al. 2004) und kommt darüber hinaus noch in anderen Vogelarten (Blank et al. 2011a; Hoffmann et al. 2011; Storz et al. 2011), im Quastenflosser, in der Chinesischen-Weichschildkröte, in der Zierschildkröte (Schwarze und Burmester 2013; Schwarze et al. 2015) und in Lungenfischen (Koch et al. 2016; Lüdemann et al. 2019) vor. Im Südamerikanischen Lungenfisch (*Lepidosiren paradoxa*) wurden multiple GbE-Kopien beschrieben, die eine hohe Expression in den Oozyten zeigen (Lüdemann et al. 2019). Das *single copy* GbE wird am stärksten im Auge exprimiert und ist dort in dem äußeren Segment der Photorezeptorzellen lokalisiert (Blank et al. 2011a; Schwarze et al. 2015). Die Lokalisation in der stoffwechselaktiven, avaskulären Retina von Vögeln und Schildkröten deutet auf eine Funktion als Sauerstofftransport- oder Sauerstoffspeicherprotein hin (Schwarze et al. 2015; Blank et al. 2011a).

Androglobin (Adgb) weist eine hohe Expression in Testis von Säugetieren auf, wodurch der Name 'Andro' - Globin [griechisch „andrós“: der Mann] entstanden ist. Adgb ist 180 kDa groß und ein chimäres Globin mit einer N-terminalen Calpain-domäne, einer internen Globin-domäne und einem Isoleucin-Glutamin (IQ)-Calmodulin-Bindemotiv (Hoogewijs et al. 2012). Genomische Untersuchungen haben gezeigt, dass Adgb in fast allen Metazoa und in Choanoflagellaten vorkommt, was auf einen frühen Ursprung vor der Radiation von Tieren schließen lässt (Abb. 3). Die Expression von Adgb steht im Zusammenhang mit den postmeiotischen Stadien der Spermatogenese. Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine erhöhte Genexpression bei fruchtbaren Männchen im Vergleich zu sterilen Männchen, was auf eine Rolle in der Spermatogenese hindeutet (Hoogewijs et al. 2012).

1.3.1 Ursprung und Phylogenie der Globine

Das diverse Vorkommen von Globinen in Bakterien, Pilzen, Protisten und Tieren (Hardison 1996; Weber und Vinogradov 2001; Vazquez-Limon et al. 2012; Vinogradov et al. 2013a; Vinogradov et al. 2013b) weist darauf hin, dass Globine von einem Protein abstammen, das bereits vor mehr als 1,5 Milliarden Jahren im letzten gemeinsamen Vorfahren aller lebenden Organismen vorkam (Burmester und Hankeln 2014). Ähnlich wie bei prokaryotischen Globinen (Freitas et al. 2005; Vinogradov et al. 2013a; Vinogradov et al. 2013b) wird vermutet, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Tierglobine eine Rolle in der sensorischen Erfassung von O₂ spielte, an der Detoxifizierung von ROS/RNS beteiligt war oder eine Art von O₂-abhängigem Enzym darstellte (Burmester und Hankeln 2014). Durch Gen- und Genomduplikation ist im Laufe der Evolution eine Genvielfalt entstanden (Ohno et al. 1968) (1.4), die in Vertebraten auch zu einer Globin-Vielfalt geführt hat. Durch physiologische Anpassung konnte eine funktionelle Differenzierung in der Globin-Superfamilie stattfinden. Die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der Globine sind noch nicht ganz geklärt. Phylogenetische Analysen zeigen aber deutlich, dass GbX, Ngb und Adgb die basale monophyletische Hauptgruppe darstellen, die sich klar von den anderen Globinen abgrenzt (Abb. 3). GbX, Ngb und Adgb kommen sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten vor, was zeigt, dass diese Globine bereits vor der Separation von Protostomia und Deuterostomia vorhanden waren (Burmester et al. 2000; Blank und Burmester 2012; Droge et al. 2012; Hoogewijs et al. 2012) und unterschiedliche Funktionen ausüben (Burmester und Hankeln 2014). Neben GbX, Ngb und Adgb besaß der Vorfahre der Vertebraten vermutlich ein weiteres Globin, aus dem, nach der

Separation von Protostomia und Deuterostomia, schließlich Hb, Mb, Cygb, GbE und GbY hervorgingen (Fuchs et al. 2006; Ebner et al. 2010; Hoffmann et al. 2010a; Storz et al. 2011; Blank und Burmester 2012). Die vertebratenspezifischen Globine (Hb, Mb, Cygb, GbE, GbY) bilden eine monophyletische Gruppe (Ebner et al. 2010; Hoffmann et al. 2010a, 2011; Storz et al. 2011). Innerhalb dieser monophyletischen Gruppe besteht ein Schwestergruppenverhältnis zwischen der α - und β -Untereinheit von Hb (Hardison 2008; Hoffmann et al. 2010b; Patel et al. 2010; Storz et al. 2011, 2013) und zwischen Mb und GbE (Abb. 3). Das Verwandtschaftsverhältnis von Mb und GbE wurde zusätzlich durch Syntenie und die phylogenetische Topologie untersucht. Die Untersuchungen zeigen auf, dass Mb und GbE Produkte einer Tandem-Genduplikation in der Stammeslinie der Gnathostoma von einem Proto-Mb/GbE-Gen sind (Hoffmann et al. 2012, 2011). Cygb hat seinen Ursprung als paraloges Gen zu dem Proto-Mb/GbE-Gen als Produkt einer *whole genom duplication* (WGD) in der Stammeslinie der Vertebraten (Hoffmann et al. 2011). Ngb und Cygb kommen in fast allen Gnathostoma vor (Burmester et al. 2000; Burmester et al. 2002; Burmester et al. 2004; Awenius et al. 2001; Trent und Hargrove 2002; Fuchs et al. 2004; Fuchs et al. 2005; Kugelstadt et al. 2004; Wystub et al. 2004; Hankeln et al. 2005; Roesner et al. 2005; Burmester und Hankeln 2009; Hoffmann et al. 2010a) und sind die am stärksten konservierten Globine (Burmester et al. 2004). Die phylogenetische Position von GbY konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden (Abb. 3).

1.4 Entstehung von multiplen Genen

Gen- und Genomduplikation spielen eine essentielle Rolle bei der Evolution von Genen und Genomen und sind Ursprung von evolutionären Neuheiten (Ohno 1970; Gu et al. 2003; Pichersky und Gang 2000; Ober 2005; Roth et al. 2007). Durch Gen- und Genomduplikation entstehen enorme Mengen an genetischem Material, aus dem durch Mutation und positive Selektion neue Gene mit veränderten oder neuen Funktionen hervorgehen (Ohno 1970; Moore und Purugganan 2003). Die Vervielfältigung von Genen kann unter anderem durch ungleiches *crossing over* zwischen homologen Chromosomen, durch Transposition von DNA-Fragmenten oder durch Polyploidization (*whole genome duplication*-WGD) entstehen (Ohno et al. 1968; Zhang 2003). Ist die Duplikation des Gens durch ungleiches *crossing over* entstanden, befinden sich die duplizierten Gene in einer Tandem-Anordnung auf demselben Chromosom. Ist durch eine WGD eine Polyploidie entstanden, befinden sich die duplizierten Gene auf unterschiedlichen Chromosomen (Ohno et al. 1968; Zhang 2003) (Abb. 4).

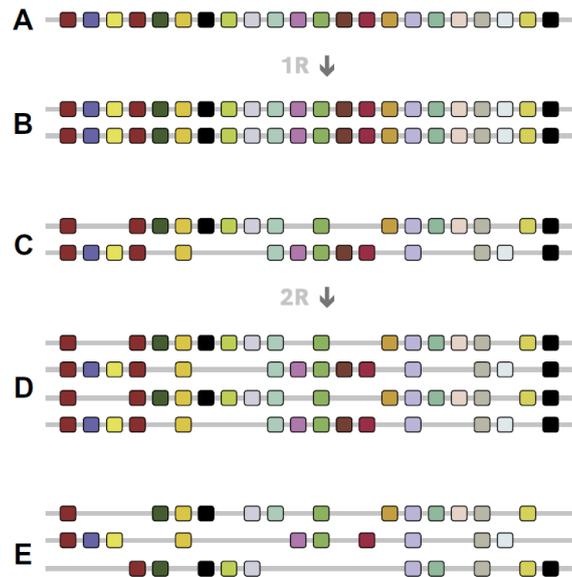


Abbildung 4 Schematische Darstellung von zwei *whole genome duplications* (WGD)

Dargestellt sind zwei hypothetische WGDs eines Genomabschnitts. Die farbigen Kästchen stellen einzelne Gene dar. (A) Schematische Darstellung eines Genomabschnitts eines Vertebraten-Vorfahren. (B) Darstellung eines verdoppelten Genomabschnitts nach einer WGD (1R). Entstanden ist ein vollständiger Satz an paralogen Genen in identischer Reihenfolge. (C) Viele der paralogen Gene werden im Laufe der Zeit aus dem Genom entfernt. (D) Die zweite WGD führt zu einem weiteren Satz an paralogen Genen in identischer Reihenfolge. Aus zwei Gen-Kopien sind nun Multigenfamilien mit vier Gen-Kopien entstanden. (E) Im Laufe der Zeit gehen weitere paraloge Gene verloren, wodurch ein komplexes Muster entsteht. Die Syntenie der Gene bleibt erhalten (Storz et al. 2013).

Während der frühen Vertebraten-Evolution kam es vermutlich zu zwei WGDs (2R-Hypothese), die zu einer erheblichen Vergrößerung des Genoms geführt haben (Panopoulou und Poustka 2005; Holland et al. 1994; Ohno 1970) (Abb. 4). Die zwei WGDs fanden vermutlich vor der Aufspaltung der Agnatha und Gnathostoma statt (Meyer und Schartl 1999; Dehal und Boore 2005; Kuraku 2008; Kuraku et al. 2009; Smith et al. 2013) und bildeten die genetische Grundlage für die Entwicklung von vertebratenspezifischen Eigenschaften (Holland et al. 1994; Meyer 1998; Braasch et al. 2009a; Braasch et al. 2009b; Van de Peer et al. 2009). Gestützt wird die 2R-Hypothese durch eine sukzessive Zunahme an Gen-Kopien während der Entwicklung von Invertebraten zu Kieferlosen-Vertebraten bis hin zu Säugetieren (Holland et al. 1994; Panopoulou und Poustka 2005). Die Zunahme an Hox-Clustern spricht ebenfalls für die 2R-Hypothese. So besitzen Invertebraten nur ein Hox-Cluster, wohingegen Vertebraten über vier Hox-Cluster („4:1 Regel“) verfügen (Schughart et al. 1989; Sidow 1996; Dehal und Boore 2005; Garcia-Fernandez und Holland 1994; Panopoulou und Poustka 2005). Die 2R-Hypothese wird aber auch angezweifelt, da einige Hinweise gegen sie sprechen (Hughes 1999; Wolfe 2001;

Meyer und Schartl 1999; Martin 2001; Lander et al. 2001; Venter et al. 2001). Diese Hinweise sprechen für eine WGD (1R-Hypothese) während der frühen Vertebraten-Evolution, gefolgt von vielen einzelnen Duplikationen großer Genomabschnitte (Gu et al. 2002; McLysaght et al. 2002; Smith und Keinath 2015). In den echten Knochenfischen (Teleostei), zu denen auch der Zebrafisch gehört, kam es zu einer dritten WGD, die als *teleost-specific-genome-duplication* (tsWGD) bezeichnet wird (Hoegg et al. 2004; Kuraku und Meyer 2009; Meyer und Schartl 1999) und vermutlich Grund für die enorme Artenvielfalt innerhalb der Teleostei ist (Amores et al. 1998; Meyer und Schartl 1999). Darüber hinaus kam es in Lachsfischen (Salmonidae) zu einer weiteren WGD (*salmonid-specific* WGD, ssWGD) (Macqueen und Johnston 2014; Lien et al. 2016), was u.a. zu einer Erweiterung des Hb-Repertoire führte (Quinn et al. 2010). Die Diversität und die funktionelle Vielfalt der Globin-Superfamilie ist vermutlich Resultat von WGDs (Hoffmann et al. 2012; Hoogewijs et al. 2012).

1.4.1 Das Schicksal duplizierter Gene

Da es nach Gen- oder Genomduplikation eher zu schädlichen Mutationen innerhalb der Genkopien kommt, wird vermutet, dass die meisten duplizierten Gene nicht lange im Genom verweilen (Moore und Purugganan 2005). Die dauerhafte Fixierung des Duplikats im Genom kann durch einen vorteilhaften Phänotypen und eine damit einhergehende positive Selektion begünstigt werden (Moore und Purugganan 2003, 2005). Nach einer Duplikation kann es zu verschiedenen Entwicklungen der duplizierten Gene kommen (Abb. 5): (A) Das duplizierte Gen kann neue Funktionen einnehmen (Neofunktionalisierung) (Ohno 1970), (B) die Funktionen des Vorläufer-Gens können auf die duplizierten Gene aufgeteilt werden (Subfunktionalisierung) (Hughes 1994; Force et al. 1999; Stoltzfus 1999), (C) die duplizierten Gene unterliegen zunächst einer Subfunktionalisierung, auf die eine Neofunktionalisierung folgt (Subneofunktionalisierung) (Rastogi und Liberles 2005; He und Zhang 2005), (D) das duplizierte Gen verliert seine Funktion und wird zum Pseudogen (Pseudogenisierung) (Ohno 1970; Walsh 1995; Lynch und Conery 2000; Lynch et al. 2001; Harrison et al. 2002) oder (E) die duplizierten Gene üben dieselben Funktionen aus, wodurch es zu einer Verstärkung kommt (Additiver Effekt).

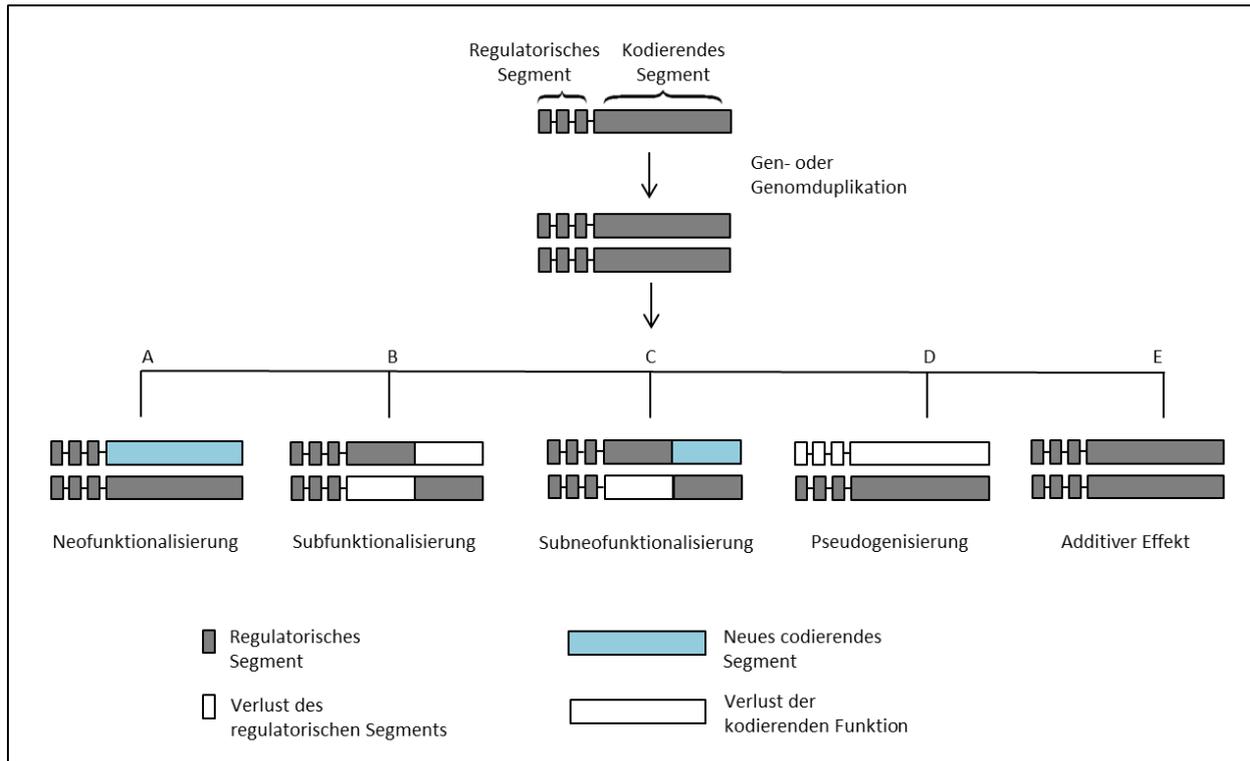


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Entwicklung von Genen nach einer Duplikation

Dargestellt ist eine Verdopplung eines hypothetischen Gens durch eine Gen- oder Genomduplikation und dessen mögliche Entwicklung. (A) Das Duplikat kann eine neue Funktion entwickeln, (B) die ursprünglichen Funktionen können sich auf die duplizierten Gene aufteilen, (C) die ursprünglichen Funktionen können sich auf die duplizierten Gene aufteilen und zusätzlich können neue Funktionen entstehen, (D) das Duplikat verliert seine Funktion, (E) beide Gen-Kopien üben dieselben Funktionen aus. Verändert und erweitert nach (Moore und Purugganan 2005).

1.4.2 Multiple Globine in Vertebraten

Obwohl in den meisten Vertebraten jeweils nur eine Kopie von *Cygb*, *Mb*, *Ngb*, *GbE* und *GbX* vorliegt, kam es im Laufe der Evolution auch zur Entstehung von multiplen Globin-Kopien. Der letzte gemeinsame Vorfahre der Vertebraten besaß vermutlich vier *GbX*-Kopien, die sich im Laufe der Evolution in etlichen Wirbeltierlinien auf eine *GbX*-Kopie reduziert haben (Gallagher und Macqueen 2017; Opazo et al. 2015). Die meisten Strahlenflosser weisen allerdings zwei *GbX*-Kopien auf (Gallagher und Macqueen 2017; Opazo et al. 2015). In Lachsfischen liegen zwei vollständig kodierende, paraloge *Ngb*-Gene vor, die vermutlich durch die *ssWGD* entstanden sind (Gallagher und Macqueen 2017). In Lungenfischen konnten fünf *GbE*-Kopien beschrieben werden, die Oozyten-spezifisch exprimiert werden und dabei Expressionslevel von *Mb* im Herzen überschreiten. In anderen Vertebraten konnte kein *GbE* in Ovarien nachgewiesen

werden, was eine spezifische Funktion von GbE im Lungenfisch vermuten lässt (Lüdemann et al. 2019).

In einigen Fischarten konnten auch duplizierte *Cygb*-Gene (Fuchs et al. 2005) und Mb-Gene (Fraser et al. 2006; Roesner et al. 2008) identifiziert werden, die im Folgenden genauer beschrieben werden (1.4.2.1 & 1.4.2.2).

1.4.2.1 Dupliziertes Cytoglobin-Gen in echten Knochenfischen (Teleostei)

Echte Knochenfische weisen zwei paraloge *Cygb*-Gene (*Cygb1* und *Cygb2*) auf, die vermutlich Resultat der tsWGD sind (Abb. 6) (Fuchs et al. 2005). Ausnahme bilden hierbei die Elopomorpha, die basale Vertreter der echten Knochenfische sind und nur eine *Cygb*-Kopie besitzen (Gallagher und Macqueen 2017). Da die Elopomorpha zu den echten Knochenfischen gehören und somit auch die Genomverdopplung durch die tsWGD erfahren haben, kam es vermutlich im Laufe der Evolution zur Eliminierung einer der beiden *Cygb*-Kopien. Im Zebrafisch weist *Cygb1* eine Größe von 174 AS (19,9 kDa) auf und evolvierte signifikant schneller als *Cygb2* (179 AS, 20,6 kDa) (Fuchs et al. 2005). Die paraloge *Cygb*-Gene zeigen unterschiedliche Expressionsmuster auf, wobei *Cygb2* in neuronalen Geweben bis zu 300-fach stärker als *Cygb1* exprimiert wird (Fuchs et al. 2005). *Cygb1* wird ubiquitärer exprimiert und ist im Vergleich zu *Cygb2* bis zu 150-fach stärker im adulten Zebrafisch detektierbar (Tiedke et al. 2011). Während der Zebrafisch-Entwicklung steigt die Expression von *Cygb2* nur allmählich an, wohingegen die Expression von *Cygb1* stärker ist und ab ~31 hpf (*hours post fertilization*) extrem ansteigt. Das deutet auf eine Involvierung von *Cygb1* bei der Organogenese hin (Tiedke et al. 2011). Bei einer Hypoxie von ~4.1 kPa wird die Expression von *Cygb1* und *Cygb2* im gesamten Zebrafisch leicht hochreguliert (Roesner et al. 2006). Die rekombinant exprimierten *Cygb1*- und *Cygb2*-Proteine vom Zebrafisch zeigen unterschiedliche kinetische Eigenschaften (Corti et al. 2016a). *Cygb1* weist Eigenschaften auf, die einem Sauerstofftransportprotein ähneln, wie etwa die Pentakoordination des Häm-Fe²⁺ im deoxygenierten Zustand und eine langsamere Autoxidationsrate. *Cygb2* ist wie das *single copy* *Cygb* des Menschen im deoxygenierten Zustand hexakoordiniert und weist eine schnellere Autoxidationsrate als *Cygb1* auf. Obwohl beide paraloge *Cygb*-Gene eine Nitritreduktase-Aktivität aufweisen, katalysiert *Cygb1* den Umsatz von NO₂ zu NO signifikant schneller (Corti et al. 2016a).

Die unterschiedlichen Expressionsmuster und die verschiedenen kinetischen Eigenschaften deuten auf unterschiedliche Funktionen hin. Um die tatsächlichen Funktionen zu verifizieren,

bedarf es weiterer Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden u.a. die phylogegetischen Verhältnisse sowie die Expression von *Cygb1* und *Cygb2* in diversen Teleostei untersucht. Des Weiteren wurden Funktionsuntersuchungen anhand verschiedener Stressversuche durchgeführt sowie Transkriptomanalysen von eigens generierten *Cygb1*-Knockout Zebrafischen ausgewertet.

1.4.2.2 Multiple Myoglobin-Gene in Strahlenflosser (Actinopterygii)

Obwohl in den meisten Vertebraten nur ein Mb-Gen vorliegt (Burmester und Hankeln 2014), konnten im Karpfen (*Cyprinus carpio*) und im Goldfisch (*Carassius auratus*) zwei Mb-Isoformen (Mb1 und Mb2) beschrieben werden (Fraser et al. 2006; Roesner et al. 2008). Während Mb1 in der Muskulatur, der Leber, den Kiemen, der Niere und in geringen Mengen im Gehirn exprimiert wird, zeigt Mb2 eine spezifische Expression in neuronalen Strukturen des Gehirns auf. Erste Untersuchungen konnten zeigen, dass Mb1 eine Rolle in der Sauerstoffversorgung und im NO-Metabolismus spielt. Mb2 ist vermutlich an der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B.: H₂O₂) in Neuronen beteiligt (Fraser et al. 2006; Roesner et al. 2008; Cossins et al. 2009; Helbo et al. 2012). Im Silbergabelbart (*Osteoglossum bicirrhosum*) und im asiatischen Gabelbart (*Scleropages formosus*), die ebenfalls zu den Teleostei gehören, konnten drei Mb-Gene (Mb α , Mb β , Mb γ) identifiziert werden (Gallagher und Macqueen 2017). Phylogenetische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Duplikationen von Mb im letzten gemeinsamen Vorfahren der Karpfenartigen bzw. der Knochenzünglerartigen stattfanden, aber bereits wieder in einigen Arten verloren gegangen sind (Qi et al. 2018; Gallagher und Macqueen 2017). Im Westafrikanischen Lungenfisch (*Protopterus annectens*) wurden sieben Myoglobin-Isoformen (PanMb1-7) beschrieben, welche unterschiedliche Expressionsmuster aufzeigen (Koch et al. 2016). Überraschenderweise werden die meisten PanMbs am stärksten im Gehirn exprimiert. Ausnahme bilden PanMb1, welches am stärksten im Muskel exprimiert wird und PanMb7, welches am stärksten im Auge vorkommt. *In vitro*-Untersuchungen konnten zeigen, dass die Produktion von ROS unter Hypoxie-Bedingungen in Anwesenheit von PanMbs verringert wird. Die tatsächlichen Funktionen der PanMbs sind unklar, die hohe Diversität deutet aber auf eine Subfunktionalisierung und/oder Neofunktionalisierung der Gene hin (Koch et al. 2016). Im Froschwels (*Clarias batrachus*) konnten 15 verschiedene Mb-Kopien (CbaMb) beschrieben werden, die vermutlich auf unterschiedlichen Chromosomen vorliegen.

Die CbaMbs zeigen ein diverses Expressionsmuster, wobei das Gehirn und die Kopfnieren die Gewebe mit den jeweils höchsten Expressionsraten sind (Li et al. 2018).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten in Flösselhechtartigen (*Polypteriformes*) multiple Mb-Gene identifiziert werden. Hierbei konnten sowohl im Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*) als auch im Flösselhecht (*Polypterus senegalus*) 15 Mb-Kopien beschrieben werden. Damit besitzen diese Fische zusammen mit dem Froschwels die größte bisher bekannte Mb-Diversität.

1.5 Strahlenflosser (Actinopterygii)

Strahlenflosser (Actinopterygii) verdanken ihren Namen den strahlenförmig angeordneten Lepidotrichia, die die Flossen stützen. Sie gehören zu den Knochenfischen (Osteichthyes), bilden mit ihrer Artenvielfalt fast die Hälfte aller Wirbeltiere und sind somit die größte Klasse innerhalb der Vertebraten (Li et al. 2007a). Ihre Artenvielfalt (Abb. 6) und ihre Besiedelung von unterschiedlichsten Habitaten machen die Strahlenflosser zu interessanten Modellorganismen, anhand derer sich diverse biologische Fragestellungen untersuchen lassen. Das größte Taxon bilden die Teleostei mit über 30.000 Arten, was ungefähr 96 % aller bekannten Fischarten entspricht. Zu den Teleostei zählen bekannte Ordnungen wie Forellenartige (Salmoniformes) und Karpfenartige (Cypriniformes) (Bartsch 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Aminosäuresequenzen, die Genexpression und die Phylogenie von *Cygb1* und *Cygb2* sowie von multiplen Mb-Genen in unterschiedlichen Strahlenflossern untersucht. Eine detailliertere Untersuchung von *Cygb1* und *Cygb2* wurde im Zebrafisch durchgeführt, der zu den Karpfenartigen und somit zu den Teleostei gehört. Eine genauere Analyse von multiplen Mb-Genen wurden im Senegal-Flösselhecht und im Flösselaal durchgeführt. Der Senegal-Flösselhecht und der Flösselaal zählen zu den Flösselhechtartigen (*Polypteriformes*) und gehören somit zu basalen Vertretern der Strahlenflosser.

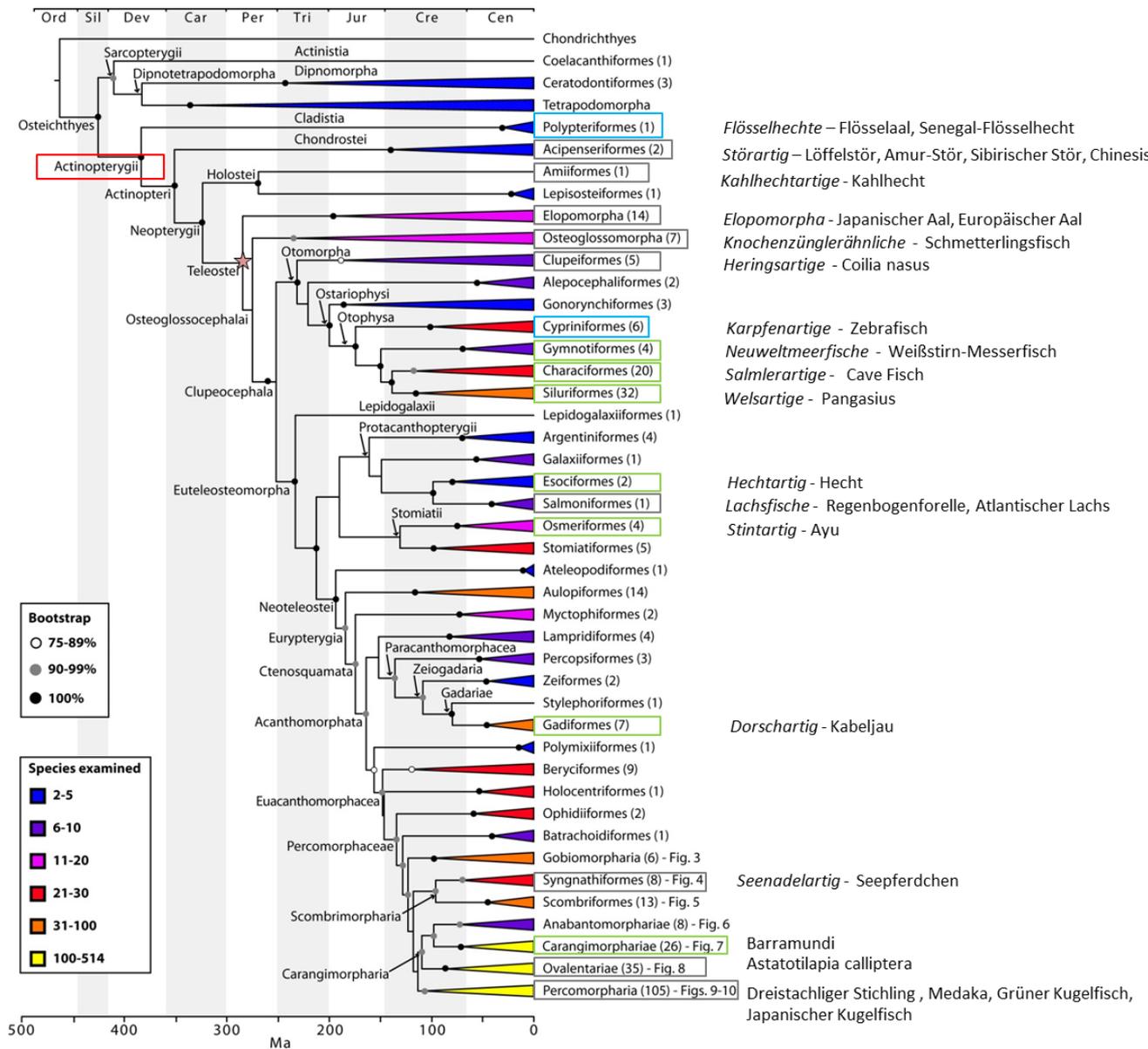


Abbildung 6 Phylogenetische Übersicht von Strahlenflosser (Actinopterygii)

Dargestellt ist die Klasse der Strahlenflosser (Actinopterygii), mit den jeweiligen Unterklassen (z.B.: Neopterygii-Neuflosser), den Teilklassen (z.B.: Holostei-Knochenganoiden) und den Ordnungen (z.B.: Polypteriformes-Flösselhechtartige). Innerhalb der farblich unterlegten Ordnungen wurden Globine, in den dahinter aufgeführten Arten, untersucht. Bei den grün unterlegten Ordnungen wurde die Globin-Expression in verschiedenen Organen untersucht. Bei den grau unterlegten und grün unterlegten Ordnungen wurden die multiplen Cygb-Gene in Aminosäuresequenz-Alignments und/oder in der Stammbaum-Analyse untersucht. Innerhalb der blau unterlegten Ordnungen wurden multiple Globin-Gene genauer untersucht. Der Zeitpunkt der tsWGD ist durch einen Stern markiert. Bearbeitet nach (Betancur et al. 2013).

1.5.1 Zebrafisch (*Danio rerio*)

Zebrafische (*Danio rerio*) gehört zu der Klasse der Strahlenflosser (Actinopterygii), zu der Unterklasse der Teleostei und zu der Ordnung der Cypriniformes (Karpfenartige) (Abb. 7B). Über die Körperflanke von Zebrafischen ziehen sich silber-schimmernde Längsstreifen, die bis in die Schwanzflossenbasis gehen (Abb. 7A).

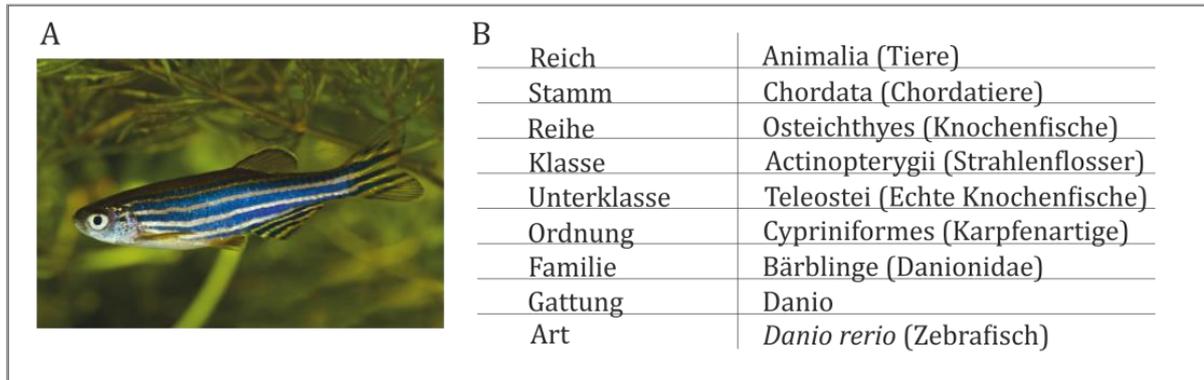


Abbildung 7 Zebrafisch (*Danio rerio*)

Dargestellt sind ein *Danio rerio*-Männchen¹ (A) und die systematische Einordnung von *Danio rerio* (Zebrafisch) (B).

Zebrafische werden ungefähr 3,5 Jahren alt und können eine Länge von fünf Zentimetern erreichen (Gerhard et al. 2002). Sie zeichnen sich durch eine schnelle Entwicklung und hohe Fruchtbarkeit aus. Zebrafische sind nach circa drei Monaten geschlechtsreif und die Weibchen können bis zu 300 Eier in der Woche ablaichen (Nasiadka and Clark 2012). Das natürliche Habitat von Zebrafischen befindet sich in Südasien (in weiten Teilen von Indien, Bangladesch, Nepal, Myanmar und Pakistan) (Rahman 1989; Barman 1991; Talwar 1991; Menon 1999; Bhat 2003). Hier bewohnen sie eine Vielzahl von Lebensräumen, zu denen Reisfelder, Oberläufe von Flüssen und Bewässerungsgräben zählen (Menon 1999; Daniels 2002; Bhat 2003). Hierbei scheinen die Zebrafische schlammige, gut bewachsene Gebiete zu präferieren (Engeszer et al. 2007).

1.5.2 Flösselhechtartige (Polypteriformes)

Flösselhechtartige gehören zu der Klasse der Strahlenflosser (Actinopterygii), zu der Unterklasse der Cladistia und bilden die Ordnung der Polypteriformes (Flösselhechtartige) (Abb. 8 B, D). Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Flösselhechtartigen die

¹ <https://brightowl.pro/blogs/2018/05/the-zebrafish-model-as-a-tool-to-explore-tumor-immunology> (25.01.2019)

basale Gruppe innerhalb der Strahlenflosser bilden und in einem Schwesterngruppenverhältnis zu allen übrigen rezenten Strahlenflossern stehen (Abb. 6). Die Flösselhechtartigen enthalten nur zwei rezente Gattungen: *Polypterus*, die aus etwa zwölf Arten besteht, und die Gattung *Erpetoichthys*, die monotypisch ist und zu der nur die Flösselaale (*Erpetoichthys calabaricus*) zählen. Den natürlichen Lebensraum von Flösselhechtartigen bilden Süßwasserflüsse und Seen des tropischen Afrikas (Suzuki et al. 2010). Flösselhechtartige besitzen Kiemen und Lungen und ihr Körper ist durch rhombische Ganoidschuppen geschützt (Rieger 2014). Sie führen ein räuberisches Leben und ernähren sich unter anderem von Fischen, Fröschen und Insektenlarven (Le Guyader und Lecointre 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden multiple Mb-Gene im Senegal-Flösselhecht (*Polypterus senegalus*) und im Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*) untersucht (Abb. 8).

<p>A</p> 	<p>B</p> <table border="1"> <tr><td>Reich</td><td>Animalia (Tiere)</td></tr> <tr><td>Stamm</td><td>Chordata (Chordatiere)</td></tr> <tr><td>Reihe</td><td>Osteichthyes (Knochenfische)</td></tr> <tr><td>Klasse</td><td>Actinopterygii (Strahlenflosser)</td></tr> <tr><td>Unterklasse</td><td>Cladistia</td></tr> <tr><td>Ordnung</td><td>Polypteriformes (Flösselhechtartige)</td></tr> <tr><td>Familie</td><td>Polypteridae (Flösselhechte)</td></tr> <tr><td>Gattung</td><td>Polypterus (Eigentliche Flösselhechte)</td></tr> <tr><td>Art</td><td><i>Polypterus senegalus</i> (Senegal-Flösselhecht)</td></tr> </table>	Reich	Animalia (Tiere)	Stamm	Chordata (Chordatiere)	Reihe	Osteichthyes (Knochenfische)	Klasse	Actinopterygii (Strahlenflosser)	Unterklasse	Cladistia	Ordnung	Polypteriformes (Flösselhechtartige)	Familie	Polypteridae (Flösselhechte)	Gattung	Polypterus (Eigentliche Flösselhechte)	Art	<i>Polypterus senegalus</i> (Senegal-Flösselhecht)
Reich	Animalia (Tiere)																		
Stamm	Chordata (Chordatiere)																		
Reihe	Osteichthyes (Knochenfische)																		
Klasse	Actinopterygii (Strahlenflosser)																		
Unterklasse	Cladistia																		
Ordnung	Polypteriformes (Flösselhechtartige)																		
Familie	Polypteridae (Flösselhechte)																		
Gattung	Polypterus (Eigentliche Flösselhechte)																		
Art	<i>Polypterus senegalus</i> (Senegal-Flösselhecht)																		
<p>C</p> 	<p>D</p> <table border="1"> <tr><td>Reich</td><td>Animalia (Tiere)</td></tr> <tr><td>Stamm</td><td>Chordata (Chordatiere)</td></tr> <tr><td>Reihe</td><td>Osteichthyes (Knochenfische)</td></tr> <tr><td>Klasse</td><td>Actinopterygii (Strahlenflosser)</td></tr> <tr><td>Unterklasse</td><td>Cladistia</td></tr> <tr><td>Ordnung</td><td>Polypteriformes (Flösselhechtartige)</td></tr> <tr><td>Familie</td><td>Polypteridae (Flösselhechte)</td></tr> <tr><td>Gattung</td><td><i>Erpetoichthys</i> (Flösselaal)</td></tr> <tr><td>Art</td><td><i>Erpetoichthys calabaricus</i> (Flösselaal)</td></tr> </table>	Reich	Animalia (Tiere)	Stamm	Chordata (Chordatiere)	Reihe	Osteichthyes (Knochenfische)	Klasse	Actinopterygii (Strahlenflosser)	Unterklasse	Cladistia	Ordnung	Polypteriformes (Flösselhechtartige)	Familie	Polypteridae (Flösselhechte)	Gattung	<i>Erpetoichthys</i> (Flösselaal)	Art	<i>Erpetoichthys calabaricus</i> (Flösselaal)
Reich	Animalia (Tiere)																		
Stamm	Chordata (Chordatiere)																		
Reihe	Osteichthyes (Knochenfische)																		
Klasse	Actinopterygii (Strahlenflosser)																		
Unterklasse	Cladistia																		
Ordnung	Polypteriformes (Flösselhechtartige)																		
Familie	Polypteridae (Flösselhechte)																		
Gattung	<i>Erpetoichthys</i> (Flösselaal)																		
Art	<i>Erpetoichthys calabaricus</i> (Flösselaal)																		

Abbildung 8 Senegal-Flösselhecht (*Polypterus senegalus*) und Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*)

Dargestellt sind Senegal-Flösselhecht (*Polypterus senegalus*)² (A) und Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*)³ (C). Die biosystematische Einordnung vom Senegal-Flösselhecht (*Polypterus senegalus*) ist in (B) aufgeführt, die vom Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*) in (D).

² <https://www.interaquaristik.de/tiere/zierfische/senegal-floesselhecht-polypterus-senegalensis-raritaet/a-8812> (30.01.2019)

³ <https://aquarius.li/flosselaal-erpetoichthys-calabaricus> (30.01.2019)

1.6 Zielsetzung

Während Hämoglobin und Myoglobin seit Jahrzehnten im Focus von biologischen und biomedizinischen Fragestellungen stehen, ist weniger über duplizierte Globin-Gene bekannt. Gen- und Genomduplikation stellen jedoch die treibende Kraft der Evolution dar und bilden den Ursprung von evolutionären Neuheiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das duplizierte *Cygb*-Gen in echten Knochenfischen, insbesondere im Zebrafisch, untersucht (A). Um zu erforschen, warum sich das duplizierte *Cygb*-Gen im Genom der meisten echten Knochenfische dauerhaft fixieren konnte und wie sich die Gene nach der Duplikation entwickelt haben, wurden folgende Fragestellungen behandelt:

(A)

- I. Untersuchungen von *Cygb1* und *Cygb2* in echten Knochenfischen
 - a. Wie haben sich *Cygb1* und *Cygb2* in echten Knochenfischen phylogenetisch entwickelt?
 - b. Ist die Expression von *Cygb1* und *Cygb2* in echten Knochenfischen konserviert?
- II. Funktions- und Lokalisationsuntersuchungen von *Cygb1* und *Cygb2* im Zebrafisch (*Danio rerio*)
 - a. Weisen *Cygb1* und *Cygb2* die gleiche zelluläre Lokalisation auf?
 - b. Wie entwickelt sich die Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* während der Embryonalentwicklung des Zebrafisches?
 - c. Verändert sich die Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* unter Einwirkung verschiedener Stressoren wie Hypoxie- und ROS-Stress?
 - i. Was sagt die Änderung des Expressionsmusters über mögliche Funktionen von *Cygb1* und *Cygb2* aus?
- III. Untersuchung von *Cygb1* CRISPR/Cas9 Zebrafisch-Knockoutmutanten (*Cygb1*^{-/-})
 - a. Entwickeln sich die *Cygb1*^{-/-} Zebrafische analog zu *Cygb1*^{+/+} Zebrafischen?
 - b. Analyse des Transkriptoms der *Cygb1*^{-/-} und *Cygb1*^{+/+} Zebrafische unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen.
 - i. Was sagt die Veränderung der Transkriptome über die Funktion von *Cygb1* aus?

Neben dem Froschwels besitzen der Flösselaal und der Flösselhecht die größte bisher bekannte Mb-Diversität. Um ein besseres Verständnis für die evolutionäre Entwicklung der multiplen Mb-Gene der Flösselhechtartigen zu erhalten, wurden folgende Fragestellungen bearbeitet (B):

(B)

- I. Phylogenetische Untersuchungen der multiplen Mb-Gene
 - a. In welchen phylogenetischen Verhältnissen stehen die multiplen Mb-Gene zueinander?
- II. Analyse der Expression der multiplen Mb-Gene in diversen Geweben des Flösselaals und des Flösselhechts
 - a. Unterscheiden sich die Expressionsmuster der Mb-Gene in verschiedenen Geweben?
 - i. Auf welches evolutionäre Schicksal deutet das Expressionsmuster hin?

Die Ergebnisse sollen zu einem besseren Verständnis der Entstehung und funktionellen Entwicklung von multiplen Globin-Genen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Modellorganismen

2.1.1 Zebrafisch (*Danio rerio*)

Die verwendeten Zebrafische stammen aus der hauseigenen Zucht und wurden ursprünglich vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie⁴ bezogen (Tübinger Stamm). Die Fische werden in einem Tages-/Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden gehalten. Die Temperatur der Becken liegt zwischen 24°C und 27°C, abhängig von der jeweiligen Jahreszeit. Die Zebrafische werden jeden Tag mit lebenden Artemien gefüttert und das Wasser der Becken wird alle zwei Wochen gewechselt. Für die Gewebeentnahme wurden die Fische in Eiswasser, welches mit MS-222 (Tricain Mesylat) versetzt war, anästhesiert und für 15 Minuten bei - 20°C euthanasiert. Die verwendeten Gewebe wurden direkt in eiskaltes Tri-Fast (VWR) überführt. Anschließend erfolgten eine RNA-Isolation (2.4.1), die reverse Transkription in cDNA (2.4.2) und die Analyse der Genexpressionsmuster via qRT-PCR (2.4.13) oder RNA-Sequenzierung (2.7).

Die Tierhandhabung und die Tierversuche wurden nach dem Tierschutzgesetz durchgeführt und vom Landesamt Hamburg genehmigt (Genehmigung 33/14).

2.1.2 Flösselhechtartige (Polypteriformes)

Für die Genexpressionsanalyse der multiplen Mb-Gene in Flösselhechtartigen wurden zwei Senegal-Flösselhechte und ein Flösselaal verwendet. Diese Tiere wurden aus öffentlichen Tierhandlungen bezogen und waren zum Zeitpunkt der Verwendung zwischen 6 cm und 18 cm groß. Die Tiere wurden zur Akklimatisierung für mindestens drei Tage in einem Aquarium mit 27 °C warmen Wasser gehalten und mit roten Mückenlarven gefüttert. Die Gewebeentnahme wurde wie bei den Zebrafischen durchgeführt (2.1.1).

2.2 Stressversuche

Für die verschiedenen Stressversuche wurden jeweils 6 männliche Zebrafische in einer Kontrollgruppe gehalten und 6 männliche Zebrafische dem jeweiligen Stressor ausgesetzt (2.2.1- 2.2.2). Anschließend wurden die Fische auf Eiswasser betäubt und für 15 Minuten

⁴ <http://eb.mpg.de/> (10.02.2019)

bei -20°C euthanasiert. Das Gewebe wurde wie unter Punkt 2.1.1 aufgeführt entnommen. Anschließend erfolgte eine RNA-Isolation (2.4.1), eine reverse Transkription für die cDNA Synthese (2.4.2) und eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR (2.4.13). Die statistische Analyse wurde unter Verwendung eines zweiseitigen t-Tests durchgeführt.

2.2.1 Hypoxie-Stress

Der Hypoxie-Versuch wurde für 48 Stunden bei 22,5°C in 25-Liter-Aquarien durchgeführt und die Fische wurden während des Experimentes nicht gefüttert. Der Sauerstoffgehalt im Hypoxie-Becken wurde unter Zugabe von Stickstoff auf ~ 2 kPa (entspricht ungefähr 10 % des normalen Sauerstoffgehaltes) eingestellt. In regelmäßigen Abständen wurde über einen Sauerstoffsensoren (Oxi 340i, WTW, Weilheim, Germany) die Sauerstoffkonzentration gemessen. Das Wasser des Normoxie-Beckens wurden mit atmosphärischer Luft begast und zeigte eine Sauerstoffkonzentration von ~ 18 kPa auf.

2.2.2 ROS-Stress

Die Entstehung von *reactive oxygen species* (ROS) wurde in der Versuchsgruppe durch die Zugabe von Endofulfan (1 µg/l) ins Aquarienwasser initiiert. Der Versuch wurde für 24 Stunden in 6-Liter-Aquarien bei einer Temperatur von 22,5°C durchgeführt und die Fische wurden während des Versuches nicht gefüttert.

2.3 Material

2.3.1 Geräte

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	3850 ELV (Tuttnauer, Breda, Niederlande)
Binokular	Olympus SZ 61, Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
Geldokumentation	Fusion FX7TM Multi-Imagingsystem, PeqLap Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Gelkammer	Horizontal, A. Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Heizblock	Bio TDB- 100 A, Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Inkubatoren	Binder CO2 Inkubator CB150 (Tuttlingen, Deutschland) Innova 4200 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific (Nürtingen, Deutschland)
Kryostat	Leica

Magnetrührer	RCT basic (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland)
Mikroskop	Olympus BX51 mit Olympus DP71 Kamera und Olympus TH3 IX50 (Hamburg, Deutschland)
Mikropipetten	Starlab
Nanodrop	Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Nanojekt	Drummond Scientific
pH-Meter	InoLab pH 720 (WTW, Weilheim, Deutschland)
Pipetus	Pipetus® Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Real-time Cyclor	7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Schüttler	Stuart See Saw Rocker SSL4 (Barloworld Scientific, Staffordshire, GB)
SDS-Gelkammer	Mini-PROTEAN Electrophoresis System (Bio-Rad, München, Deutschland)
Spannungsgeber	Consort EV243, Jencons (Bedfordshire, GB)
Spektrophotometer	NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Peqlap Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Sterilwerkbänke	Lamin Air® LB-48-C und Lamin Air® HV2448, Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Thermocycler	T-Personal Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Vortexer	Vortex-2- Genie Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Waagen	VWR Scientific Education Sartorius BP210S, Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Wasserbad	GFL® Wasserbad (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417 R (Hamburg, Deutschland) Eppendorf Centrifuge 5804 (Hamburg, Deutschland) Laborzentrifuge Sigma (Hartenstein) (Osterode (Harz), Deutschland) Sigma, Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)

2.3.2 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und kommerzielle Kits

Verwendete Verbrauchsmaterialien, wie Reaktionsgefäße (0,2 ml/0,5 ml/1,5 ml/2 ml), Zentrifugenröhrchen (Falcons; 15 ml/50 ml), Kunststoffpipetten (5 ml/10 ml/25 ml) und Pipettenspitzen, wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Hirschmann (Eberstadt), Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf) und Starlab (Ahrensburg) bezogen. Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Die verwendeten Kits stammten von den Firmen Biolabproducts (Gödenstorf), Invitrogen (Karlsruhe), Peqlab (Erlangen), Promega (Mannheim) und Qiagen (Hilden). Alle Stammlösungen und die daraus

hergestellten Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Die Sterilisation erfolgte entweder durch Autoklavieren (20 Minuten bei 121°C) oder durch Sterilfiltration (sterile Spritzenfilter, Porengröße: 0,45 µm, Carl Roth (Karlsruhe)).

2.3.3 Enzyme

Folgende Enzyme (Polymerasen, DNase, Endonukleasen, Restriktionsnekleasen, Ligasen) wurde im Rahmen der Arbeit verwendet (Tab. 2):

Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Polymerasen	
AccuPrime-Taq-DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Pfu-Polymerase	Promega
Mol-Taq-Polymerase	Molzym
Ligase	
T4 DNA-Ligase	Promega
DNase	
RNase-Free DNase	Qiagen
Restriktionsnekleasen	
Apal	Thermo Fisher Scientific
PstI	Thermo Fisher Scientific
NdeI	Thermo Fisher Scientific
BamHI	Thermo Fisher Scientific
XhoI	Thermo Fisher Scientific
Sall	NEB
BglII	NEB
Bsm BI	NEB
Endonukleasen	
Cas9 Nuclease, <i>S. pyogenes</i>	NEB
EnGen Cas9 NLS, <i>S. pyogenes</i>	NEB

2.3.4 Vektoren

Die verwendeten Vektoren sind in Tabelle 4 zusammengefasst:

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Hersteller
pGEM-T	Ampicillin	Promega, Mannheim
pET16b	Ampicillin	Thermo Fisher Scientific
pT7cas9sgRNA2	Ampicillin	Sigma Aldrich

2.3.5 Primer

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Primer wurden auf Grundlage frei zugänglicher Sequenzen erstellt⁵. Die Primer für die spezifische Amplifizierung der multiplen Myoglobin-Gene im Flösselaal und Flösselhecht wurden auf Grundlage von eigens generierten Gen-Sequenzen (2.8.1) erstellt. Die Primer wurden mit „Snap Gene Viewer“ designt und mit dem Oligo Analyzer⁶ und dem OligoCalc⁷ auf folgende Kriterien hin untersucht:

- Schmelzpunkt der Primer etwa 60°C
- Länge der Primer etwa 20 Nukleotide
- AT-Gehalt der Primersequenz etwa 50 %
- Cut off Delta G \geq -10kcal/mol bei der Bildung von Homo- und Heterodimeren

2.3.6 Antikörper

Die verwendeten Antikörper (α -*Cygb1* und α -*Cygb2*) wurden von der Firma „Davids Biotechnologie“⁸ hergestellt. Hierfür wurden *Cygb1* und *Cygb2* des Zebrafischs rekombinant exprimiert (2.9.2) und für die Immunisierung zu „Davids Biotechnologie“ geschickt. Die Entnahme des Serums und die Aufreinigung der Antikörper wurden von der Firma vorgenommen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung der gesamten RNA aus den verschiedenen Geweben der Versuchstiere (2.1) wurde nach der *one step* Methode durchgeführt (Chomczynski und Sacchi 1987). Hierfür wurden die Gewebestücke in 500 μ l „Tri FastTM“ (PeqLap) überführt, welches Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält, was zur Lysis der Zellen und Inaktivierung von Enzymen führt. Das Gewebe wurde zusätzlich mit Hilfe des 3D-Homogenisators (Bertin) mechanisch zerkleinert (4x, 10 Sekunden). Anschließend wurden die Proben mit 150 μ l Chloroform versetzt, 30 Sekunden gevortext, 10 Minuten bei RT inkubiert und für 10 Minuten bei 1200 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit demselben Volumen an 70 %igen EtoH

⁵ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (11.02.2019)

⁶ <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (11.02.2019)

⁷ <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> (11.02.2019)

⁸ <https://www.davids-bio.de/> (11.02.2019)

versetzt. Die Aufreinigung der RNA wurde mittels einer Silicatmembran des „Crystal RNA Mini Kit´s“ (Biolab) nach Herstellerangaben durchgeführt, inklusive des optionalen DNase Verdaus. Die RNA wurde in 30 µl HPLC-H₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit´s“ (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden 1000 ng Gesamt-RNA eingesetzt, außer beim Zebrafisch-Herzen, hier wurden 200 ng verwendet.

2.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur selektiven, exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde eine PCR mit einem Gemisch aus der „AccuPrime DNA Polymerase“ (Thermo Fischer Scientific) und der „Pfu-Polymerase“ (Promega) durchgeführt. Die Annealing-Temperaturen wurden abhängig von den Primern gewählt und lagen zwischen 57°C und 62°C. Die verwendeten PCR-Programme sind in folgenden Tabellen (Tab. 4, Tab. 5) zusammengefasst.

Tabelle 4 PCR-Ansatz und PCR-Programm für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten ausgehend von einem cDNA Template

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
cDNA Template	0,5 µl			
Primer forward	1 µl	94°C	2 min	
Primer reverse	1 µl	94°C	30 sec	
dNTP (je 10mM)	1 µl	X°C	30 sec	40 x
10xAccuPrime Puffer	2,5 µl	68°C	1 min	
MgCl ₂ (50mM)	1 µl	68°C	10 min	
Accu-Prime	0,25 µl	12°C	∞	
Pfu-Polymerase	0,25 µl			
HPLC-H ₂ O	auf 25 µl auffüllen			

Tabelle 5 PCR-Ansatz und PCR-Programm für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Genotypisierung von Zebrafischen

Die DNA wurde mit Hilfe der *hot shot* Methode isoliert (2.6.3.1).

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
DNA Template (Hot shot)	2,5 µl			
Primer forward	1 µl	94°C	2 min	
Primer reverse	1 µl	94°C	30 sec	
dNTP (je 10mM)	1 µl	X°C	30 sec	40 x
10xAccuPrime Puffer	2,5 µl	68°C	1 min	
MgCl ₂ (50mM)	1 µl	68°C	10 min	
Accu-Prime	0,25 µl	12°C	∞	
Pfu-Polymerase	0,25 µl			
HPLC-H ₂ O	auf 25 µl auffüllen			

2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren

Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese lassen sich Nucleinsäuren ihrer Größe nach auftrennen. Hierfür wird ein Spannungsfeld an das Agarosegel angelegt, in dem die negativ geladenen Nucleinsäuren zur Anode wandern. Unter Verwendung eines Standards (Leiter) lassen sich die genauen Größen der untersuchten Proben ermitteln.

2.4.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %ige Agarosegele verwendet, die in 1x TBE Puffer gelaufen sind. Die Proben wurden mit 5 x *Loading-dye* versetzt und als Standard wurde der „GeneRuler DNA Ladder Mix“ (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Je nach Größe der Fragmente sind die Gele zwischen 30 Minuten und 1 Stunde bei 120 Volt gelaufen. Für die Detektion der DNA-Fragmente wurde das Gel nach dem Lauf in ein Ethidiumbromid-Bad (0,001 %) überführt. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer „Fusion Fx7 Geldokumentation“ (PeqLab).

2.4.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Für die Auftrennung der RNA wurden 1 %ige denaturierende, formaldehydhaltige Agarosegele verwendet, die in 1x MOPS Puffer gelaufen sind. Es wurden 200 ng-500 ng der isolierten RNA mit demselben Volumen 2x RNA-Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific) versetzt und für 10

über 3'-terminale Thymin-Überhänge verfügt. Diese Thymin-Überhänge ermöglichen eine Klonierung von PCR-Produkten, die mittels *Taq*-Polymerasen amplifiziert wurden und dadurch Adenin-Überhänge aufweisen. Eine T4-DNA-Ligase verbindet die zueinander komplementären Überhänge der PCR-Produkte und des Vektors unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen kovalent miteinander. Die Ligation wurde bei einer Stunde Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Der Ligationsansatz für die Klonierung in pGEM-T wurde wie folgt angesetzt:

Reaktionsansatz	1 µl Vektor pGEMT-T
	5 µl 2x Ligase-Puffer
	1 µl T4 DNA-Ligase
	X µl aufgereinigtes PCR-Produkt
	3 - X µl HPLC-H ₂ O

Als Expressionsvektor wurde im Rahmen dieser Arbeit pET16b verwendet, der im Gegensatz zu pGEM-T nicht linearisiert vorliegt. Um pET16b zu linearisieren, wurde zunächst ein Restriktionsverdau vorgenommen (2.9.2), der ebenfalls mit dem einzuklonierenden DNA-Fragment durchgeführt wurde. Dadurch, dass der Restriktionsverdau sowohl mit dem pET16b Vektor als auch mit dem DNA-Fragment durchgeführt wurde, wurden komplementäre Überhänge erzeugt, die eine gerichtete Klonierung ermöglichen. Die Ligation wurde bei einer Stunde Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Für die Ligation in pET16b wurde folgender Reaktionsansatz angesetzt:

Reaktionsansatz	1 µl Linearisierter pET16 b Vektor
	5 µl 2x Ligation-Puffer
	1 µl T4 DNA-Ligase (3 U/µl)
	X µl aufgereinigtes und verdautes PCR-Produkt
	3 - X µl HPLC-H ₂ O

2.4.6.2 Transformation

Um Plasmide zu amplifizieren oder bakterielle Expressionssysteme herzustellen, wird eine Transformation durchgeführt, bei der freie DNA in kompetente Bakterienzellen aufgenommen

wird. Durch eine erhöhte Permeabilität der Bakterienzellmembran, die beispielsweise durch die Behandlung mit Calciumchlorid zustande kommt, wird die Aufnahmefähigkeit der Zellen gefördert. Für die Amplifizierung von Plasmiden wurde der Klonierungsstamm JM109 (Promega) verwendet und für die Expression der Expressionsstamm Rosetta2(DE3)pLysS (Novagen). Für die Transformation wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

Reaktionsansatz	25 µl kompetente Bakterienzellen
	4 µl Ligationsansatz

Der Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 50 Sekunden auf 42°C erhitzt und schließlich für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 475 µl LB-Medium zum Transformationsansatz wurden die Zellen für 1,5 Stunden bei 37°C im Brutschrank geschüttelt (125 rpm). 50 µl - 450 µl der Bakteriensuspensionen wurden anschließend auf vorgewärmten Selektionsplatten mit entsprechenden Antibiotika (pGEM-T auf IPTG-X-Gal-Amp-Platten, pET16b auf Amp-Platten, pJET1.2/blunt auf Amp-Platten) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.7 Selektion positiver Bakterienklone

Bakterien, die einen pGEM-T- oder pET16b-Vektor aufgenommen haben, weisen eine Ampicillin-Resistenz auf, die es ihnen ermöglicht, auf den Selektionsplatten zu wachsen. Zusätzlich verfügt pGEM-T über ein weiteres Selektionsmerkmal. Innerhalb der *multiple cloning site* (MCS) von pGEM-T befindet sich der α -Abschnitt eines β -Galactosidase-Gens (LacZ-Gen). Das Genom des verwendeten *E. coli* Stammes weist den ω -Abschnitt der β -Galactosidase auf. Werden beide Abschnitte exprimiert, findet eine α -Komplementierung statt und β -Galactosidase katalysiert die Hydrolyse von X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlorindoxyl, welches in Verbindung mit O₂ eine intensive Blaufärbung aufweist. Bei einer erfolgreichen Integration des Inserts in die MCS wird das Leseraster des Lac-Z-Gens so verschoben, dass X-Gal nicht umgesetzt werden kann und die Klone eine deutliche Weißfärbung zeigen. Weiße Kolonien wurden direkt mit einer Pipettenspitze gepickt und in 5 ml LB-Nährmedium und 50 µl Ampicillin (10 mg/ml) überführt und konnten so über Nacht bei 37 °C wachsen.

2.4.8 Dauerkulturen

Um rekombinante Klone dauerhaft lagern zu können, wurden Dauerkulturen angefertigt. Hierfür wurden von der jeweiligen Bakterienkultur 700 µl mit 300 µl Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf konnten aus den Dauerkulturen frische Über-Nacht-Kulturen angesetzt werden.

2.4.9 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse unter Verwendung des Peq-GOLD Plasmid Miniprep Kit's (Peqlab-Biotechnologie GmbH). Hierfür wurden die Bakterienzellen zunächst mittels Zentrifugation vom Nährmedium getrennt und in einem RNase-haltigen Puffer resuspendiert. Die Plasmide wurden durch Zellyse mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und NaOH aus den Zellen isoliert. Über eine Silicamembran wurden die Plasmide aufgereinigt und in 50 µl HPLC-H₂O eluiert.

2.4.10 Sequenzierung

Um Klonierungen oder PCR-Produkte zu überprüfen, wurden diese nach *Sanger* bei Eurofins mittels GATC Service⁹ sequenziert. Hierfür wurde folgender Ansatz vorgelegt:

Reaktionsansatz	2,5 µl Primer (T7 oder sequenzspezifisch)
	400 ng-700 ng Plasmid oder PCR-Produkt

2.4.11 Überprüfen der Klonierung mittels Restriktionsverdau

Neben der Selektion von positiven Klonen (2.4.7) können Klonierungen mittels eines Restriktionsverdaus überprüft werden. Der Restriktionsverdau wurde bei pGEM-T für 3 Stunden bei 37°C durchgeführt und wie folgt angesetzt:

Reaktionsansatz	8 µg pGEMT-T
	1 µl Tango-Puffer
	0,5 µl Apal
	0,5 µl PstI

⁹ <https://www.eurofinsgenomics.eu/de/custom-dna-sequencing/gatc-services/> (20.01.2019)

2.4.12 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren von Verunreinigungen zu befreien oder ihre Konzentration zu erhöhen, können die Proben mittels Ethanolfällung aufgereinigt oder eingeeengt werden. Hierfür werden die Proben mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100 %igen Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 1 Stunde bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 90 µl 70 %igen Ethanol resuspendiert. Die Proben wurden erneut bei 14000 g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Waschen in 70 %igen Ethanol mit der anschließenden Zentrifugation wurde wiederholt. Der Überstand wurde anschließend erneut abgenommen. Bevor das Pellet in 10 µl - 30 µl HPLC-H₂O resuspendieren wurde, wurde gewartet, bis das restliche Ethanol bei Raumtemperatur verfliegen war.

2.4.13 Quantitative Real Time-Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine modifizierte Form der PCR und ermöglicht die Detektion der PCR-Produkte während der Amplifizierung. Als Matrize dient cDNA, die aus einer gleichen Ausgangsmenge an RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wurde (2.4.2). Die Detektion der PCR-Produkte findet am Ende jedes Zyklus´ statt. Hierbei wird die Fluoreszenz, die sich proportional zum PCR-Produkt verhält, gemessen und graphisch dargestellt (Abb. 9).

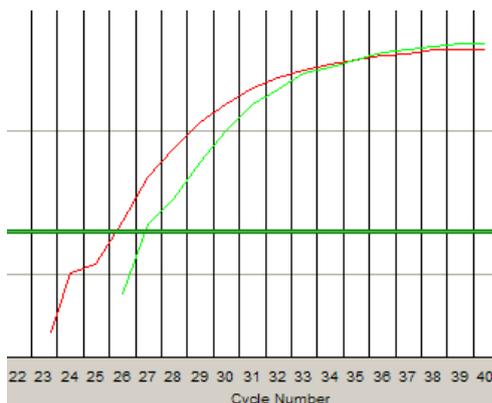


Abbildung 9 Graphische Darstellung einer qRT-PCR von zwei Amplifikaten

Dargestellt ist die Amplifizierung zweier Proben (rote und grüne Kurve) mittels qRT-PCR. Auf der X-Achse ist die Anzahl der Zyklen aufgetragen, auf der Y-Achse die der Fluoreszenz. An welchem Abschnitt die Fluoreszenz der einzelnen Proben gemessen wird, wird von dem Schwellenwert (Threshold, grün) festgelegt. Der „ct-Wert“ („cycle of threshold“) gibt den Punkt an, an dem die Fluoreszenzkurve den Threshold schneidet. Probe eins (rote Kurve) wird

um den Faktor zwei stärker exprimiert als Probe zwei (grüne Kurve) und wird genau einen Zyklus (also einen ct-Wert) früher detektiert¹⁰.

Zur Quantifizierung wird eine Plasmid-Verdünnungsreihe mitgeführt, deren Kopienzahl bekannt ist. Der mitgeführte Plasmid enthält das zu untersuchende Gen als Integrat, wodurch das gleiche PCR-Produkt wie bei den Proben generiert wird. Die absoluten Kopienzahlen der Standard-Plasmide werden wie folgt berechnet:

- $Y \cdot 10^6$ g/mol entsprechen $6,022 \cdot 10^{23}$ Kopien/mol | : Y
- 10^6 g entsprechen $X \cdot 10^{23}$ Kopien | Umrechnung von g auf ng
- 10^{15} ng entsprechen $X \cdot 10^{23}$ Kopien | : 10^{15}
- 1 ng entsprechen $X \cdot 10^8$ Kopien | · die Plasmidkonz. Q ng/μl
- x ng/μl entsprechen $X \cdot 10^8 \cdot Q$ Kopien/μl

Anhand der Verdünnungsreihe der Standard-Plasmide kann eine Eichgerade erstellt werden, wodurch sich eine Quantifizierung der Proben vornehmen lässt. Die Amplifizierung wurde mit Hilfe eines spezifischen qRT-PCR-Programms (Tab. 6) durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz wurde hierfür vorgelegt:

- Reaktionsansatz 5 μl Power SYBR®-Green PCR Master Mix
- 0,3 μl forward-Primer (10 μM)
- 0,3 μl reverse-Primer (10 μM)
- 1 μl cDNA
- 3,4 μl HPLC-H₂O

Tabelle 6 Reaktionsprotokoll für die qRT-PCR mit anschließender Schmelzpunktanalyse

PCR-Programm			
Primäre Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	40 x
Annealing	60°C	15 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Schmelzkurvenanalyse	95°C	15 sec	2 x
	60°C	30 sec	

¹⁰ Laborpraktikum Molekulare Tierphysiologie, Skript Sommersemester 2014

Die qRT-PCR wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) unter Anwendung des Power-SYBR-Green-PCR-Mastermix (Applied Biosystems) durchgeführt.

2.5 *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung (ISH) ermöglicht den Nachweis von spezifischer mRNA in einzelnen Zellen in cytologischen und histologischen Präparaten. Für die Detektion der endogenen mRNA werden bei der ISH Digoxigenin (DIG) markierte RNA-Sonden verwendet, die mittels *in vitro*-Transkription hergestellt werden. Nach der Basenpaarung (Hybridisierung) der markierten RNA-Sonden an die Zielsequenz wird gegen DIG ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper eingesetzt. Ein hinzugegebenes NBT/BCIP-Gemisch wird durch die alkalische Phosphatase zu einem unlöslichen blauen Präzipitat umgesetzt, welches lichtmikroskopisch detektiert werden kann.

2.5.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die entsprechenden Gewebe auf Trockeneis in einem *vinyl specimen mold* (Sakura) mit dem Einbettmedium „Tissue Tek[®]“ fixiert. Die eingebetteten Gewebe wurden mit einem Kryostaten (Leica) in 8 µM-18 µM dicke Schnitte geschnitten. Hierbei lagen die Temperaturen der Schneidekammer und die des Objektisches bei -20 °C. Die Schnitte wurden auf Objektträgern (Super Frost Ultra Plus, Thermo Fisher Scientific) gezogen und für etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

2.5.2 Herstellung der Sonde

Für die *in vitro*-Transkription der antisense-RNA-Sonden wurden linearisierte Plasmide als DNA-Template genutzt. Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz für 3 Stunden bei 37°C inkubiert:

Reaktionsansatz	2 µl 10xTango Puffer
	2 µl PstI
	1 µg pGEM-T
	Auf 20 µl mit HPLC-H ₂ O auffüllen

Die verwendeten Plasmide verfügten über die RNA-Sonden-Sequenz als Integrat und wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit von Kim Dräger angefertigt. Die *in vitro*-Transkription wurde mit jeweils 1 µg linearisiertem Plasmid mit Hilfe des „Dig RNA Labeling Kits (SP6/T7)“ (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Hersteller-Angaben durchgeführt.

2.5.3 Markierungseffizienztest mittels Dot-Blot

Um die Effizienz der *in vitro*-transkribierten antisense-RNA-Sonden zu testen, wurde ein Dot-Blot durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000) der RNA-Sonden und einer Kontroll-RNA (DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) Roche) mit einem Verdünnungspuffer erstellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde je 1 µl auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham™ Protan™ 0,45 µm, GE Healthcare Life Science) aufgetragen und für 10 Minuten unter UV-Licht fixiert. Nach der Fixierung wurde die Membran für 5 Minuten in Puffer A gewaschen und anschließend für 15 Minuten in Puffer B äquilibriert. Die Hybridisierung erfolgte durch mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten (Roche Diagnostics), für 1 Stunde in einer 1:1000 Verdünnung in Puffer B. Bevor die Membran für 15 Minuten in Puffer C äquilibriert wurde, wurde sie zweimal für jeweils 10 Minuten in Puffer A gewaschen. Unter Lichtausschluss wurde die Farbreaktion mittels Detektionspuffer durchgeführt. Die Reaktion wurde nach Eintreten eines deutlichen Signals mit VE-Wasser gestoppt.

RNA-Verdünnungspuffer	5 ml DEPC-H ₂ O 3 ml 20x SSC-Puffer 2 ml 37 % Formaldehyd
Puffer A	3,03 g TRIS (100 mM, MW 121,14 g/mol) 2,19 g NaCl (150 mM, MW 58,44 g/mol) ad 250 ml DEPC-H ₂ O pH 7,5
Puffer B	0,5 g Blocking Reagent (1 %, Roche Diagnostics, Mannheim) 50 ml Puffer A
Puffer C	1,21 g TRIS (100 mM, MW 121,14 g/mol) 0,58 g NaCl (100 mM, MW 58,44 g/mol) ad 100 ml DEPC-H ₂ O pH 9,5

Detektionslösung	3,3 µl BCIP
	6,6 µl NBT
	pro ml AP-Puffer

2.5.4 *In situ*-Hybridisierung an Gewebeschnitten

Für die *in situ*-Hybridisierung an Gefrierschnitten (2.5.1) wurden die Schnitte für 20 Minuten von -80°C in -20°C überführt, bevor sie für 20 Minuten in 4 % PFA fixiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in PBSt bei Raumtemperatur refixiert und 20 Minuten in 1x PBS äquilibriert. Die RNA-Sonden wurden mit 4 µl Formamid versetzt und für 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Die restliche Hybridisierungslösung wurde auf 42°C vorgewärmt. Die *in situ*-Hybridisierung wurde über Nacht in einer Feuchtkammer bei 55°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst für 30 Minuten in 4x SSC Lösung gewaschen, gefolgt von zweimal waschen für 5 Minuten in 2x SSC, 15 Minuten waschen in RNase-Lösung, dreimal waschen für 5 Minuten in 2x SSC-Lösung, 5 Minuten waschen in 1x PBSt und 15 Minuten waschen Puffer B. Der mit der alkalischen Phosphatase gekoppelte Antikörper (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:1000 auf die Schnitte gegeben. Nach dem Inkubieren wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten in 1x PBS gewaschen und für 15 Minuten in Puffer C inkubiert. Der Detektionspuffer wurde unter Lichtausschluss auf die Schnitte gegeben. Nach einer deutlichen Signalbildung wurde die Reaktion durch die Zugabe einer Stopplösung unterbrochen. Eingebettet wurden die Proben in 1x PBS mit Glycerin (1:9).

Hybridisierungslösung	Formamide - 25,0 ml - 50 % formamide
	20x SSC - 12,5 ml - 5x SSC
	Heparin 5 mg/ml - 0,5 ml - 50 µg/ml
	tRNA 50 mg/ml - 0,5 ml - 500 µg/ml
	Tween 20 20 % - 0,25 ml - 0,1 %
	Acide citrique 1M - 0,46 ml → pH 6
	H ₂ O to 50 ml
PBSt (0,1 %)	300 µl Tween 20
	300 ml 1x PBS
20xSSC Puffer pH 7	17,53 g NaCl

	8,82 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
	100 ml DEPC-H ₂ O
	anschließend autoklavieren
RNase A-Lösung (10 mg/ml)	0,02 g RNase A
	2 ml DEPC-H ₂ O
	100 µl Aliquots herstellen
	(Aufbewahrung bei -20°C)
Detektionslösung	12,2 µl BCIP
	6,6 µl NBT
	pro ml 2 ml Puffer C
Stopp-Lösung	1,21 g TRIS
	200 µl 0,5M EDTA
	100 ml DEPC-H ₂ O
	pH 7,4

2.5.5 *Whole mount in situ*-Hybridisierung

Die *whole mount in situ*-Hybridisierung wurde bei Zebrafisch-Embryonen vorgenommen, die sich in Entwicklungsstadien zwischen 48 hpf und 120 hpf befanden. Durchgeführt wurde die *whole mount in situ*-Hybridisierung nach einem etablierten Protokoll von Thisse (Thisse und Thisse 2008). Die Detektion der RNA-Sonden erfolgte mittels der alkalischen Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente (Roche Diagnostics, Mannheim) (1:5000) und eines NBT/BCIP Detektionsgemisches.

Hybridisierungspuffer 1	Formamide-25,0 ml-50 % formamide
	20 x SSC - 12,5 ml - 5 x SSC
	Heparin 5 mg/ml - 0,5 ml-50 µg/ml
	tRNA 50 mg/ml - 0,5 ml - 500 µg/ml
	Tween 20 20 % - 0,25 ml - 0,1 %
	Acide citrique 1M-0,46 ml →pH 6
	H ₂ O to 50 ml
Hybridisierungspuffer 2	Tris HCl pH 9,5 1M - 10 ml - 100 mM
	MgCl ₂ 1M-5 ml - 50 mM

	NaCl 5M - 2 ml - 100 mM
	Tween 20 20 % - 0,5 ml - 0,1 %
	H ₂ O to 50 ml
Detektionslösung	3,5 µl BCIP
	4,5 µl NBT
	pro ml AP-Puffer
Stopp-Lösung	1x PBS
	1 mM EDTA
	pH 5,5

2.6 Generierung einer *Cygb1*-Knockoutmutante mittels CRISPR/Cas9

Mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems lassen sich gezielt Modifizierungen an zu untersuchenden Genen vornehmen. Das CRISPR/Cas9 System besteht aus zwei Hauptkomponenten, der Endonuklease (Cas9) und einer guide-RNA (gRNA). Die gRNA beherbergt eine zum Zielgen komplementäre Sequenz (crRNA) und eine konstante Sequenz, die die Bindestelle zur Cas9-Endonuklease darstellt (tracrRNA). Über homologe Basenpaarung kann die crRNA an die Zielsequenz binden, woraufhin Cas9 den Komplex bindet und den Doppelstrangbruch drei Basenpaare (bp) *upstream* zu der PAM-(*protospacer adjacent motif*) Sequenz generiert. Die PAM-Sequenz dient der Cas9-Endonuklease als Erkennungs-Sequenz und besteht aus drei Basen, die speziesspezifisch sind. Der Doppelstrangbruch wird über den *non-homologous end joining* (NHEJ) Reparaturmechanismus wieder verknüpft, wodurch Indel- oder Deletions-Mutationen entstehen können. Um die Effekte der Genmutation zu erhöhen, sollte die gRNA möglichst nahe am N-Terminus des Zielgens lokalisiert sein und in einem Exon liegen (Zhu et al. 2014; Jao et al. 2013).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die crRNA selbst designt und die gRNA wurde *in vitro* transkribiert. Die Cas9-Endonuklease wurde von einem kommerziellen Hersteller bezogen (2.2.3, NEB).

2.6.1 Guide-RNA

Für die Generierung der guide-RNA (gRNA) wurden zwei verschiedene Protokolle etabliert. Zum einen wurde für die *in vitro*-Transkription der gRNA ein linearisierter pT7cas9sgRNA2 (2.6.1.1.)

0,5 µl T4 Ligase

Mit H₂O auf 10 µl Gesamtvolumen bringen

Tabelle 8 Reaktionsprotokoll für *One Step Digestion/Ligation*

Cycler-Programm			
Verdau	37°C	20 min	3x
Ligation	16°C	15 min	
Verdau	37°C	10 min	1x
Inaktivierung der Enzyme	55°C	15 min	
	80°C	15 min	

Um Plasmide als DNA-Template nutzen zu können, müssen diese vorher linearisiert werden. Um pT7cas9sgRNA2 zu linearisieren, wurde folgender Reaktionsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert:

Reaktionsansatz

- 2 µl Bam HI
- 2,5 µl Bam HI Puffer
- 2 µg pT7cas9sgRNA2
- Auf 25 µl mit HPLC-H₂O auffüllen

Die *in vitro*-Transkription der gRNA wurde nach Herstellerangaben mit dem MEGAscript T7 kit Ambion/Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

2.6.1.2 Generierung der gRNA nach Gagnon

Für die Generierung der gRNA nach Gagnon (Gagnon et al. 2014) wurden die Sequenzen mit Hilfe des Webtools CHOPCHOP¹⁴ designt. Die ausgewählte crRNA-Sequenz wurde zwischen einer sp6-Promotor-Sequenz und einer Teilsequenz der tracrRNA eingebettet (Tab. 9).

Tabelle 9 Übersicht der gRNA-Sequenzen für die *in vitro*-Transkription nach Gagnon

Dargestellt ist die **crRNA in Rot**, der **sp6-Promotor in Grün** und eine Teilsequenz der konstanten tracrRNA in Schwarz. Es wurden für *Cygb1* zwei gRNA-Sequenzen in Exon 1 designt.

gRNA Oligos	
Dre <i>Cygb1</i> _sp6_gRNA I	5' ATTTAGGTGACACTATA TGTGTGTGATCCAGGACACG GTTTTAGAGC TAGAAATAGCAAG 3'
Dre <i>Cygb1</i> _sp6_gRNA II	5' ATTTAGGTGACACTATA GAGTCCTGACTCTCTGACGG GTTTTAGAGC TAGAAATAGCAAG 3'

¹⁴ <http://chopchop.cbu.uib.no/> (04.02,2019)

Nachdem die designten Sequenzen (Tab. 9) und die konstante tracrRNA bei Eurofins¹⁵ bestellt worden waren, wurden diese mittels *annealing* zusammengefügt und die freien Enden wurden mit Nukleotiden aufgefüllt (Abb. 10). Die *in vitro*-Transkription wurde mit dem MEGAscript sp6 kit Ambion/Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt.

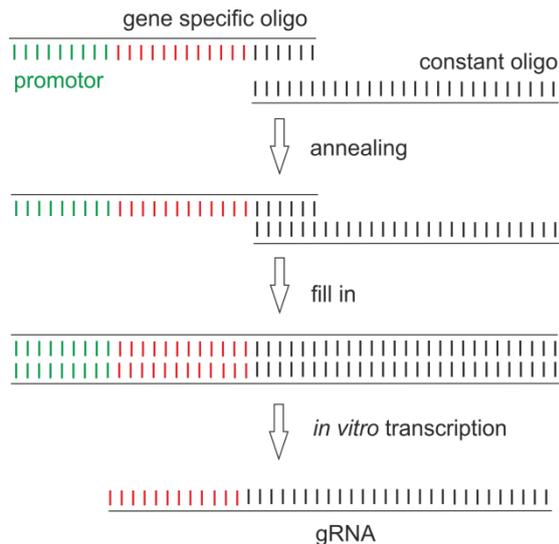


Abbildung 10 Generierung der gRNA nach Gagnon

Dargestellt ist die sp6-Promotorsequenz (grün), die spezifische crRNA-Sequenz (rot) und die konstante tracrRNA-Sequenz. Der überlappende Bereich wird zunächst *annealed*, anschließend werden die Enden mit Nucleotiden aufgefüllt und der dabei entstehende Doppelstrang wird als Template für die *in vitro*-Transkription genutzt. Nach (Gagnon et al. 2014).

2.6.2 Injektion der CRISPR/Cas9-Komponenten

Die Injektion der CRISPR/Cas9-Komponenten erfolgte in einzellige Zebrafischeier und wurde mit dem Nanoject III (Drummond Scientific) durchgeführt. Vor jeder Injektion wurde ein Gemisch an gRNA, Cas9 und Injektionsmedium erstellt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei lag die Konzentration der gRNAs zwischen 100 pg und 300 pg und die Konzentration der Cas9-Endonuklease (EnGen Cas9 NLS, *S. pyogenes*) zwischen 500 pg und 850 pg pro injiziertem Ei. Insgesamt wurde ein Volumen von 2,3 nl pro Ei injiziert und das Injektionsmedium wurde wie folgt angesetzt:

Injektionsmedium	50 µl Phenol-red
------------------	------------------

¹⁵ <https://www.eurofins.de/> (04.02.2019)

0,09 g KCl (120 mM)
0,048 g HEPES (20 mM)
mit HPLC H₂O auf 10 ml auffüllen
pH von 7 einstellen

2.6.3 Genotypisierung der *Cygb1*-Knockoutmutanten

2.6.3.1 Isolierung von genomischer DNA mittels *hot shot*

Um den Genotyp der putativen Knockoutmutanten zu bestimmen, wurde eine Amplifizierung (2.4.3) des Zielgens vorgenommen. Die hierfür benötigte DNA der putativen Knockoutmutanten wurde mit Hilfe der *hot shot*-Methode (Montero-Pau et al. 2008) isoliert. Die Schwanzflossenbiopsie wurde mittels *fin clipping* durchgeführt (Wilkinson et al. 2013). Die Fische wurden vor der Flossenbiopsie in 0,002 % MS-222 ruhiggestellt und schließlich in 0,02 % MS-222 betäubt. Hierfür wurde folgende Stocklösung hergestellt:

0,4 % MS-222-Lösung	2 g MS-222 (Tricain)
	490 ml Millipore-H ₂ O
	10 ml 1M Tris, pH 9,5
	pH von 7,5 einstellen
	Lagerung bei -20°C

Das isolierte Flossengewebe wurde in 50 µl Lysis-Reagenz überführt und für 30 Minuten auf 95°C erhitzt.

Lysis-Reagenz	25 mM NaOH
	0,2mM EDTA
	pH 12

Nachdem sich das Gewebe bei 95°C im Lysis-Reagenz aufgelöst hatte, wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C abgekühlt. Durch die Zugabe desselben Volumens Neutralisierungsreagenz wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Das Neutralisierungs-Reagenz wurde wie folgt angesetzt:

Wildtypen oder einen homozygoten Knockout. Entstehen nach der Anlagerung heteroduplexe Fragmente, liegt ein Gemisch aus Wildtyp- und Knockoutsequenz vor. Durch die Anlagerung unterschiedlicher Fragmente entstehen Sekundärstrukturen, die dazu führen, dass die Fragmente langsamer durch die PAGE laufen. Heteroduplexe Fragmente bilden daher unterschiedliche Banden aus und unterscheiden sich deutlich von homoduplexen Fragmenten (Abb. 11).

Um zu überprüfen, ob es sich bei heteroduplexen Fragmenten um Wildtypen oder homozygote Knockoutmutanten handelt, kann das entsprechende PCR-Produkt mit einer Wildtypsequenz gepoolt werden. Entstehen hierdurch heteroduplexe Fragmente, handelt es sich um eine homozygote Knockoutmutante. Die native PAGE wurde wie folgt angesetzt:

15 % Native PAGE	4 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)
	4 ml 1x TBE Puffer
	8 µl TEMED
	80 µl 10 % APS
	1,40 Std bei 140 V

2.6.4 Etablierung einer stabilen *Cygb1*-Knockoutlinie

Nach erfolgreicher Generierung eines CRISPR/Cas9 *founder*-Fisches, wurde dieser verpaart, um eine stabile homozygote Knockoutlinie zu etablieren (Abb. 12, F0). Der *Cygb1 founder* Fisch war ein heterozygoter Mosaik-Knockoutfisch, wodurch an die Nachkommen unterschiedliche Genotypen vererbt wurden (F1). Entsprechend des Genotyps wurden die Fische in Gruppen aufgeteilt und innerhalb dieser Gruppen verpaart (F2). Die Verpaarung führte zu circa 25 % homozygoten Knockoutmutanten, die erneut verpaart wurden (F3).

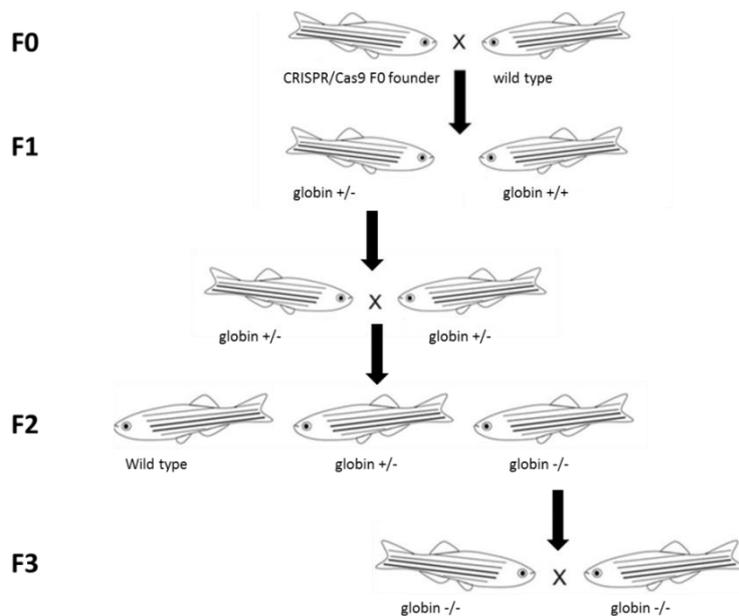


Abbildung 12 Zuchtplan zur Etablierung einer homozygoten Knockoutlinie

Der *Cygb1 founder* Fisch wurde mit einem Wildtypen verpaart (F0). Die Nachkommen (F1) sind ein Gemisch aus $Cygb1^{+/+}$ und verschiedenen $Cygb1^{+/-}$ -Genotypen. Die $Cygb1^{+/-}$ wurden ihrem Genotyp entsprechend in verschiedene Gruppen eingeordnet und innerhalb der Gruppen miteinander verpaart. Daraus resultierten $Cygb1^{+/+}$, $Cygb1^{+/-}$ und $Cygb1^{-/-}$ (F2). Die $Cygb1^{-/-}$ wurden miteinander verpaart (F3). Zur Etablierung einer stabilen *Cygb1*-Knockoutlinie wurden die F3 Fische nochmals miteinander verpaart.

2.7 Transkriptomanalyse der *Cygb1*-Knockoutmutanten

Um ein besseres Verständnis für die Funktion von *Cygb1* zu entwickeln, wurden Transkriptomprofile von *Cygb1*-Knockoutmutanten im Vergleich zu *Cygb1*-Wildtypen analysiert. Hierbei wurden zwei verschiedene physiologische Zustände verglichen: Normoxie (~19 kPa) und Hypoxie (2 kPa). Es wurden Leber- und Gehirn-Transkriptomprofile von jeweils sechs *Cygb1*-Knockoutmutanten und sechs *Cygb1*-Wildtypen angefertigt, wobei jeweils drei Fische unter Normoxie- und drei Fische unter Hypoxie-Bedingungen gehalten wurden (2.2.1). Um Einflüsse von hormonellen Schwankungen auszuschließen, wurden für die Experimente ausschließlich Zebrafisch-Männchen verwendet. Nach 48 Stunden unter Normoxie- oder Hypoxie-Bedingungen wurde die RNA aus der Leber und aus dem Gehirn isoliert (2.4.1). Um mittels qRT-PCR (2.4.13) zu überprüfen, ob eine Hypoxie-Antwort hervorgerufen wurde (gemessen durch Hsp27, Ergebnisse nicht gezeigt), wurden von jeder Probe 100 ng für eine cDNA Synthese (2.4.2) eingesetzt. Für die Sequenzierung wurden von jeder Probe ~1000 ng verschickt. Die

Sequenzierung der Transkriptome erfolgte durch die Firma Genewiz¹⁶. Die 24 Proben wurden mittels der Illumina-HiSeq Methode sequenziert und es wurden 150 bp-lange *paired end reads* generiert. Die Auswertung der Transkriptome erfolgte an der CLC-Workbench 11.0.1 (2.7.1 - 2.7.8).

2.7.1 QC Report

Der QC-Report (*Quality Control*) spiegelt die Qualität der Reads wider, indem beispielweise die GC-Verteilung ermittelt wird oder der Gehalt der Basen über die gesamte Länge der Reads bestimmt wird. Auffällig waren bei den vorliegenden Transkriptomen das vermehrte Auftreten von 5-Mers und die ungleiche Verteilung der Nukleotide über die ersten 15 Basenpaare. Daraufhin wurden die Reads getrimmt (2.7.2).

2.7.2 Trimming der Reads

Da die Sequenzierung der ersten 15 Basenpaare Ungenauigkeiten aufzeigten und vermehrt 5-Mers an 3´Ende der Reads vorlagen, wurden die Reads getrimmt. Hierfür wurden die ersten 15 Basenpaare der Reads entfernt und ein automatisches *read-through adapter trimming* durchgeführt. Des Weiteren wurde ein quality score von 0,05 festgelegt, eine maximale Anzahl von zwei N´s wurde erlaubt und alle Reads, die unter einer Basenpaarlänge von 20 lagen, wurden entfernt.

2.7.3 Mapping

Um die Genexpression der einzelnen Gene innerhalb des Transkriptoms zu bestimmen, wurden Mappings durchgeführt. Als Referenz wurde das aktuellste Genom des Zebrafisches verwendet (DreZ11¹⁷). Des Weiteren wurden als *gene track DreZ11 Gene* und als *mRNA track DreZ11 mRNA verwendet*. Die Expression wurde als TPM (*transcripts per million*) ermittelt. Das Mapping wurde mit folgenden Parametern durchgeführt (Tab. 10):

¹⁶ <https://www.genewiz.com/en-GB/> (12.03.2019)

¹⁷ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=danio+rerio> (12.02.2019)

Tabelle 10 Übersicht der Mapping-Parameter für die eigens generierten Transkriptome

Parameter	Erläuterung	Einstellung
<i>Mismatch cost</i>	Erlaubte Austausche zwischen Read und Referenz	2
<i>Insertion cost</i>	Maximale Anzahl an <i>Insertion</i> im Reads	3
<i>Deletion cost</i>	Maximale Anzahl an <i>Deletion</i> im Read	3
<i>Length fraction</i>	Prozentuale Längen-Übereinstimmung des Reads zur Referenz	0,95
<i>Similarity fraction</i>	Prozentuale Sequenz-Übereinstimmung des Reads zur Referenz	0,95
<i>Global alignment</i>	Wenn ein Read nicht vollständig aligniert, könnte das Ende des Alignments mehrere Austausche beinhalten	aktiviert
<i>Strand specific</i>	Orientierung des Mappings	<i>reverse</i>
<i>Maximum number of hits for read</i>	Maximale Anzahl von <i>hits</i> eines Reads an verschiedenen Bereichen	10
<i>Auto-detected paired distances</i>	Ermittelt den Abstand zwischen den <i>paired-reads</i>	aktiviert

2.7.4 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal component analysis-PCA*) ist ein Verfahren der multivariaten Statistik und dient dazu diverse Variablen eines umfangreichen Datensatzes (hier von Mappings) vereinfacht darzustellen. Hierfür werden wesentliche Linearkombinationen (Hauptkomponenten) so zusammengefasst, dass zwei Hauptkomponenten entstehen, die den größten Teil der Variabilitäten erklären. Die Hauptkomponenten werden in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hauptkomponentenanalysen für alle vorliegenden Transkriptom-Datensätze sowie für kleinere Vergleichsgruppen innerhalb der Gehirn- und der Leber- Transkriptome angefertigt.

2.7.5 Differentiale Expressionsanalysen

Mit Hilfe der differentialen Expressionsanalysen lassen sich signifikante quantitative Änderungen der Genexpression zwischen zwei Gruppen analysieren. Die Expressionsunterschiede wurden in folgenden Konstellationen miteinander verglichen (Tab. 11):

Tabelle 11 Übersicht der Gruppen, in denen differentiale Expressionsanalysen vorgenommen wurden

Gewebe	Versuchsbedingung		Genotyp	Kontrollgruppe
Leber	Normoxie		WT vs. KO	WT
		Hypoxie	WT vs. KO	WT
	Normoxie vs.	Hypoxie	WT	Normoxie
	Normoxie vs.	Hypoxie		Normoxie
			KO	
Gehirn	Normoxie		WT vs. KO	WT
		Hypoxie	WT vs. KO	WT
	Normoxie vs.	Hypoxie	WT	Normoxie
	Normoxie vs.	Hypoxie		Normoxie
			KO	

2.7.6 Heatmap

Um eine Verbildlichung der Expressionsunterschiede unterschiedlicher Gruppen darzustellen, wurden Heatmaps erstellt. Hierbei wurden nur Gene berücksichtigt, die einen *fold change* von mindestens 3 aufzeigten und mit einem FDR-p-value (*false discovery rate probability value*) von 0,05 unterstützt wurden. Als statistische Filter wurden die Ergebnisse der differentiellen Expressionsanalyse verwendet.

2.7.7 Venn-Diagramm

Neben den Heatmaps wurden Venn-Diagramme für die Veranschaulichung der Expressionsunterschiede erstellt. Die Venn-Diagramme basieren auf den Ergebnissen der differentiellen Expressionsanalyse. Es wurde jeweils ein Venn-Diagramm für die Expressionsunterschiede im Gehirn und in der Leber erstellt.

2.7.8 Panther

Panther¹⁸ (*protein analysis through evolutionary relationships*) ist ein Klassifizierungssystem, das auf einer Datenbank aus Gen- und Proteinfamilien mit dazugehörigen funktionellen Eigenschaften beruht. Panther ist Teil des *Gene Ontology* (GO) Referenz-Genom-Projektes, in dessen Fokus eine weltweite Vereinheitlichung der Beschreibung von Genen steht. Das Einordnen der Gene findet hierbei entsprechend der Beteiligung an biologischen Prozessen, molekularen Funktionen und der Lokalisation in zellulären Kompartimenten statt. Mit Hilfe von Panther wurde die *Gene Ontology* (GO) Annotation der regulierten Gene durchgeführt. Hierfür

¹⁸ <http://www.pantherdb.org/> (13.03.19)

wurden die entsprechenden Gene-ID Listen aus CLC kopiert und bei Panther eingeladen. Es wurde eine funktionelle Klassifizierung der Gene ermittelt sowie ein *statistical overrepresentation test* durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in einer Grafik und tabellarisch zusammengefasst.

2.8 Bioinformatische Methoden

2.8.1 Ermittlung der Globin-Sequenzen in diversen Strahlenflossern (Actinopterygii)

Die Sequenz-, Phylogenie- und Genexpressions-Analysen wurden basierend auf SRA-Transkriptom-Datensätzen (*sequence read archive*) durchgeführt (Anhang Tab.1). Hierfür wurden die jeweiligen SRA-Datensätze zunächst im SRA-Toolkit¹⁹ mit folgendem Befehl als Fastq-dump Dateien heruntergeladen:

Befehl, Download als Fastq-dump: SRA-Daten>fastq-dump --split-files SRRXXX

Die Datensätze wurden anschließend in den HPC-Server des Rechenzentrums der Universität Hamburg (Hummel) eingeladen („prefetch SRRXXX“). Um die Datensätze für die Erstellung von Assemblys mittels Trinity²⁰ kompatibel zu machen, wurde folgender Befehl verwendet:

Befehl, Kompatibilität für Trinity: fastq-dump --defline-seq '@\${sn}[_\${rn}]/\${ri}' --split-files
SRR1984648 -O \$Speicherort

Es wurde ein Assembly für die Fischarten erstellt, von denen auf NCBI keine annotierten Globin-Sequenzen vorlagen. Das Assembly wurde mit folgendem Befehl durchgeführt:

Befehl, Erstellung eines Assemblys: Trinity --seqType fq --CPU 8 --max_memory 60G --
left \$WORK/Sra-
Daten/Eca/SRRXXX_1.fastq,\$WORK/Sra-
Daten/Eca/SRRXXX_1.fastq --right \$WORK/Sra-
Daten/Loeffelstoer/SRRXXX_2.fastq,\$WORK/Sra-
Daten/Eca/SRRXXX_2.fastq --trimmomatic --
full_cleanup --output \$WORK/Sra-Daten/Eca/trinity

¹⁹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/docs/toolkitsoft/> (01.03.2019)

²⁰ <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki> (01.03.2019)

Um die Globin-Sequenzen der jeweiligen Fischarten zu ermitteln, wurde basierend auf Ghostx²¹ eine Blast-Analyse mit einer Datenbank aus bereits bekannten Globin-Sequenzen durchgeführt. Hierfür wurde folgender Befehl verwendet:

Befehl, Blast-Analyse (Ghostx): `ghostx db -i Ghostx_Globin.fas -o Datenbank_Globin`

Anschließend wurden die Assemblies mit einem *Large Text File Viewer*²² geöffnet und die *Contigs* mit einer Übereinstimmung zur Globin-Datenbank extrahiert. Die Sequenzen der *Contigs* wurden zur Ermittlung der *coding sequence* (CDS) in den *open reading frame reader*²³ eingeladen. Zur Validierung der Sequenzen wurde eine *blastx*²⁴ Analyse auf NCBI durchgeführt. Die so ermittelten Sequenzen wurden für die Sequenzanalyse (2.8.2), die Stammbaumanalyse (2.8.3) und für die Genexpressionsanalyse (2.8.4) verwendet.

2.8.2 Sequenzanalysen

Um Variabilitäten von *Cygb1* und *Cygb2* in den Teleostei und der multiplen Mb-Gene in den Polypteriformes zu untersuchen, wurden Alignments erstellt. Die Aminosäure-Sequenzen, die wie unter Punkt 2.8.1 ermittelt wurden, wurden hierfür zunächst in MAFFT-Version7²⁵ eingeladen und die resultierenden Alignments in GeneDoc 2.7²⁶ überführt und ausgewertet.

2.8.3 Stammbaumanalysen

Um phylogenetische Verhältnisse von *Cygb1*, *Cygb2* und der multiplen Mb-Gene zu untersuchen, wurden Stammbaumanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die Sequenzen als Fasta-Format in MAFFT-Version7 eingeladen und das resultierende Alignment wurde als Fasta-Format im Text-Editor als Nexus-Datei gespeichert. Die Nexus-Datei wurde in SeqVerter²⁷ eingeladen und unter „Merge sequences (multiple sequence file)“ als „Nexus/PAUP“ exportiert. Die Nexus-Datei wurde unter Verwendung des Dayhoff+I+G-Modells in MrBayes Version 3.2.2²⁸ eingeladen, um den Stammbaum zu berechnen. Die Berechnung erfolgte über 5 Millionen

²¹ <http://www.bi.cs.titech.ac.jp/ghostx/> (01.03.2019)

²² <https://www.portablefreeware.com/?id=693> (01.03.2019)

²³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> (01.03.2019)

²⁴ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (01.03.2019)

²⁵ <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> (04.03.2019)

²⁶ <https://genedoc.software.informer.com/2.7/> (04.03.2019)

²⁷ <http://genestudio.com/seqverter> (04.03.2019)

²⁸ <http://nbisweden.github.io/MrBayes/download.html> (04.03.2019)

Generationen und nach jeder tausendsten Generation wurde eine Stichprobe genommen und die posterioren Wahrscheinlichkeiten ermittelt. Nach Beendigung der Analyse wurden die ersten 25 % der berechneten Stammbäume verworfen und die übrigen Bäume in einem Konsensusbaum vereint.

2.8.4 Genexpressionsanalyse mittels RNA-Seq

Um die Genexpression von *Cygb1*, *Cygb2* und den multiplen Mb-Genen zu untersuchen, wurden, neben der qRT-PCR (2.4.13), *RNA-Seq*-Mappings durchgeführt. Die Mappings wurden an der CLC-Workbench 11.0.1 unter Verwendung folgender Parameter durchgeführt (Tab. 12):

Tabelle 12 Übersicht der Mapping-Parameter.

Parameter	Erläuterung	Einstellung
<i>Mismatch cost</i>	Erlaubte Austausch zwischen Read und Referenz	2
<i>Insertion cost</i>	Maximale Anzahl an <i>Insertion</i> im Reads	3
<i>Deletion cost</i>	Maximale Anzahl an <i>Deletion</i> im Read	3
<i>Length fraction</i>	Prozentuale Längen-Übereinstimmung des Reads zur Referenz	0,90
<i>Similarity fraction</i>	Prozentuale Sequenz-Übereinstimmung des Reads zur Referenz	0,90
<i>Global alignment</i>	Wenn ein Read nicht vollständig aligniert, könnte das Ende des Alignments mehrere Austausch beinhalten	aktiviert
<i>Strand specific</i>	Orientierung des Mappings	<i>forward</i> und <i>reverse</i>
<i>Maximum number of hits for read</i>	Maximale Anzahl von <i>hits</i> eines Reads an verschiedenen Bereichen	10

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Immunhistochemie

Mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen lässt sich die genaue zelluläre Lokalisation von bestimmten Proteinen untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* mit spezifisch dafür hergestellten Antikörpern untersucht (2.3.6). Hierfür wurden die Gefrierschnitte (2.5.1) für 20 Minuten von der -80°C-Tiefkühltruhe in die -20°C-Tiefkühltruhe überführt, bevor sie für 30 Minuten bei RT in 4 % PFA fixiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 10 Minuten in 1x PBS gewaschen. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurde auf jeden Schnitt 50 µl einer 1%igen BSA-Lösung (Bovine Serum Albumin;

gelöst in 1x PBS) gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Die Bindung des Primär-Antikörpers erfolge in einer Verdünnung von 1:500 über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C. Der Primär-Antikörper wurde in 1x PBS-T-BSA (1x PBS inkl. 1% BSA+ 0,4 % Tween) verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für 10 Minuten in 1x PBS gewaschen, bevor der Sekundär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 dazugegeben wurde. Der Sekundär-Antikörper wurde in 1x PBS verdünnt und für 1,5 Stunden bei RT im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal für jeweils 10 Minuten in 1x PBS gewaschen, bevor eine Zellkernfärbung mittels Hoechst 33258 durchgeführt wurde. Unter Lichtausschluss konnte Hoechst 33258 in einer Verdünnung von 1:1000 (in HPLC-H₂O) für 30 Minuten inkubieren. Die Schnitte wurden nach einem erneuten dreimaligen Waschen in 1x PBS in Glycerin und 1x PBS (9:1) eingedeckelt.

2.9.2 Rekombinante Expression

Unter der rekombinanten Expression versteht man die gezielte Synthese großer Mengen eines gewünschten Genproduktes. Hierfür gibt es eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Expressionssysteme, die sich u.a. durch ihre Selektionsmarker und Promotoren unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Expressionsvektor pET16b und kompetente Rosetta2(DE3)pLysS-Bakterienzellen (Novagen) verwendet. Die Klonierung von *DreCygb1* in pET16b wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme XhoI und NdeI vorgenommen. Für den Restriktionsverdau des Expressionsvektors pET16b wurde der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert und für 20 Minuten bei 65°C gestoppt. Hierfür wurde folgender Ansatz vorgelegt:

Reaktionsansatz	1 µg pET16b oder aufgereinigtes PCR-Produkt
	2 µl 10x FD Puffer
	1,5 µL XhoI
	1,5 µl NdeI
	Auf 20 µl mit HPLC-H ₂ O auffüllen

DreCygb2 lag bereits als fertiges Expressionskonstrukt vor. Für die rekombinante Expression wurden aus den *Cygb1* und *Cygb2* Dauerkulturen (2.4.8) 5 ml Über-Nacht-Kulturen im LB-Medium angesetzt. Zu dem Medium wurden 50 µL Ampicillin und 5 µl Chloramphenicol

gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde jeweils 1 Liter L-Medium mit der Über-Nacht-Kultur, mit 1 ml Chloramphenicol, mit 10 ml Ampicillin und mit 1 ml Aminolävulinsäure versetzt. Die Kulturen wurden bei 37°C inkubiert, bis die optische Dichte, bei 600 nm (OD_{600}), einen Wert zwischen 0,4 und 0,8 erreichte. Nach dem Erreichen des gewünschten OD_{600} -Wertes wurde 1 ml Induktionskontrolle abgenommen und bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 μ l 2x Lämmli-Puffer aufgenommen, gevortext und für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Induktionskontrolle bei -20°C gelagert. Die Induktion der Expression von *Cygb1* und *Cygb2* erfolgte durch Zugabe von 1 ml 0,4 M IPTG-Stammlösung. Die rekombinante Expression wurde über Nacht bei 27°C durchgeführt. Vor dem Zellaufschluss wurde 1 ml Expressionskontrolle abgenommen. Diese wurde, wie die Induktionskontrolle, mit 2x Lämmli-Puffer versetzt, denaturiert und bei -20 °C gelagert.

4x Lämmli-Puffer	1,25 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
	2 ml 10 % SDS (w/v)
	1 ml Glycerin
	0,25 ml Millipore-H ₂ O
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	Vor Gebrauch 10 % β -Mercaptoethanol zufügen
	Arbeitslösung: 900 μ l 4x Lämmli
	+ 100 μ l β -Mercaptoethanol

2.9.3 Zellaufschluss nach der rekombinanten Expression

Durch den Zellaufschluss werden die exprimierten Proteine freigesetzt und von unlöslichen Zelltrümmern befreit. Hierfür wurden die Bakterienkulturen in 500 ml Zentrifugenbecher überführt und für 40 Minuten bei 4°C und 4000 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 18,75 ml Protease Inhibitor aufgenommen.

Protease Inhibitor Puffer	50 ml 50 mM Tris-HCl
	80 mg 1 mM Dithiothreitol
	1 Tablette Complete
	12 mg 1 mM Pefabloc
	50 μ l 1 mM MgCl ₂

16 µl DNase

2 Spatelspitzen RNase

Durch ein wiederholtes Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff und einem anschließenden Auftauen im Wasserbad bei 37°C erfolgte der Zellaufschluss. Durch den Wechsel der Aggregatzustände kommt es zu einer Deformation der Zellen, wodurch die Zellmembran bricht. Die Zellsuspension wurde anschließend auf Eis gestellt und mit Ultraschall in 30-Sekunden-Intervallen sonifiziert. Für einen DNase- und RNase-Verdau wurde das Zelllysat für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 1 Stunde bei 4°C und 4500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und das Pellet wurde in demselben Volumen 1x PBS resuspendiert. Es wurden jeweils 50 µl vom Überstand und vom gelösten Pellet mit 16,5 µl 4x Lämmli versetzt, bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Der Überstand enthält die freigesetzten Proteine und wurde bei 4°C gelagert.

2.9.4 Aufreinigung von Proteinen via His60 Ni Säulchen

Die im Überstand gelösten rekombinanten Proteine wurden mit den His60 Ni Superflow Resin & Gravity Columns (Clontech, Heidelberg) aufgereinigt. Durch die Expression der Zielgene mit dem pET16b Vektor kommt es zu einer Fusion des Proteins mit einem Hexapeptid der Aminosäure Histidin (His-Tag). Dieses ermöglicht die Aufreinigung des Fusionsproteins über eine Affinitätschromatographie. Nickelionen, die in den His60 Ni Säulchen enthalten sind, interagieren mit dem His-Tag der Proteine und bilden Chelatkomplexe aus, die eine Bindung der rekombinanten Proteine an die Säule möglich machen. Alle ungebundenen Proteine werden unter Verwendung eines Imidazol-Gradienten von der Matrix verdrängt und ausgewaschen. Hierfür äquilibrierten die verwendeten Säulchen und Puffer zunächst auf Raumtemperatur. Die Säulchen wurden mit 5 ml Äquilibriumspuffer gewaschen, bevor 5 ml des Überstands aufgetragen wurden. Die Bindung der Proteine an die His60 Ni Säulchen erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Überkopfschüttler. Am nächsten Tag wurden nach dem Ablassen des Durchflusses erneut 5 ml Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Bindung der Proteine erfolgte hierbei für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler. Das Ablassen des Durchflusses und das Auftragen des Überstandes wurden so lange wiederholt, bis der gesamte Überstand aufgebraucht war. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 5 ml

Äquibrierungspuffer und Waschpuffer gewaschen und dabei für 10 Minuten auf einem Überkopfschüttler invertiert. Eluiert wurden die rekombinanten Proteine in 20 ml Elutionspuffer und der Durchfluss wurde in 2 ml Eppendorfgefäßen gesammelt. Die Induktionskontrolle, die Expressionskontrolle, das gelöste Pellet sowie der aufgereinigte Überstand wurden auf einem SDS-Gel analysiert (Tab. 13, Tab. 14). Des Weiteren wurden *Cygb1* und *Cygb2*, für die Herstellung von spezifischen Antikörpern (2.3.6), umgepuffert (2.9.8).

His-Äquibrierungspuffer	50 mM Natriumhydrogenphosphat 300 mM NaCl 20 mM Imidazol, pH 7,4
His-Elutionspuffer	50 mM Natriumhydrogenphosphat 300 mM NaCl 300 mM Imidazol pH 7,4
His-Waschpuffer	50 mM Natriumhydrogenphosphat 300 mM NaCl 40 mM Imidazol pH 7,4

2.9.5 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteine absorbieren entsprechend ihres Gehaltes an aromatischen Aminosäuren ultraviolettes Licht im Bereich von 200 nm-300 nm. Daher lässt sich die Proteinkonzentration einer Probe durch eine Messung bei 280 nm abschätzen. Dabei entspricht die Konzentration eines Proteingemisches bei 1 OD 1 mg/ml. Bei Globinen liegt in etwa eine Konzentration von 0,7 mg/ml bei einer OD von 1 vor. Die rekombinant exprimierten Globine wurden für die Messung 1:20 in 1x PBS verdünnt.

2.9.6 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Unter Verwendung einer SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) lassen sich Proteine im elektrischen Feld ihrer Größe nach auftrennen. Durch die Zugabe des anionischen Detergens SDS, was an hydrophobe Bereiche der Proteine bindet

und sie denaturiert, wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, wodurch konstante Nettoladungen pro Masseneinheit entstehen. Zur Auftrennung der rekombinant hergestellten Proteine wurden 15 %ige und 12 %ige SDS-Gele verwendet (Tab. 13, Tab. 14).

Tabelle 13 Pipetierschema für zwei 12 %ige Polyacrylamidgele

12 %ige SDS-PAGE		
Reagenzien SDS-Gel	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)	3,2 ml	0,45 ml
1,5 M Tris, pH 8,5	2 ml	---
0,5 m Tris, pH 6,8	---	0,8 ml
10 % SDS	80 µl	30 µl
Millipore-H ₂ O	2,64 ml	2 ml
TEMED	3,2 µl	3 µl
10 % APS	80 µl	30 µl
Gesamtvolumen	9 ml	3,6 ml

Tabelle 14 Pipetierschema für zwei 15 %ige Polyacrylamidgele

15 %ige SDS-PAGE		
Reagenzien SDS-Gel	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)	3,5 ml	0,45 ml
1,5 M Tris, pH 8,5	1,75 ml	---
0,5 m Tris, pH 6,8	---	0,8 ml
10 % SDS	70 µl	30 µl
Millipore-H ₂ O	1,75 ml	2 ml
TEMED	7 µl	3 µl
10 % APS	70 µl (80 µl)	30 µl

Vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE wurden alle Proben mit Lämmli-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Als Proteinstandard wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (10 kDa - 170 kDa, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) mitgeführt.

10x SDS-Laufpuffer

230 mM Tris (MG 121,12 g/mol) 27,92 g

1,9 M Glycin (MG 75,07 g/mol) 142,63 g

2 % SDS (MG 288,38 g/mol) 20,00 g

1000 ml Millipore-H₂O

2.9.7 Coomassie-Färbung

Für die Proteinfärbung wurde das Trenngel in Coomassie-Färbelösung überführt und für 1 Stunde oder über Nacht inkubiert.

Coomassie-Färbelösung	2 g Coomassie Brilliantblau
	400 ml Ethanol (< 99 %)
	175 ml 60 % Essigsäure
	425 ml Millipore-H ₂ O

Anschließend wurde das Trenngel für 1 Stunde in SDS- Entfärbelösung inkubiert.

Entfärbelösung für Coomassie	100 ml Essigsäure
	250 ml Isopropanol
	1000 ml Millipore-H ₂ O

Aufbewahrt wurden die Gele bei Raumtemperatur auf einer Wippe in folgender Lösung:

Aufbewahrungspuffer für SDS-Gele	75 ml Essigsäure
	925 ml Millipore-H ₂ O

2.9.8 Umpuffern von rekombinanten Proteinen

Für die Herstellung der Antikörper mussten die Proteine in einem Puffer ohne toxische Substanzen vorliegen. Daher wurden *Cygb1* und *Cygb2* nach der rekombinanten Expression in 1x PBS umgepuffert. Die Umpufferung erfolgte mit Amicon® Ultra Centrifugal Filters (Merk) nach Herstellerangaben.

3 Ergebnisse

3.1 Dupliziertes *Cygb*-Gen in echten Knochenfischen (Teleostei)

Um ein besseres Verständnis für die Evolution und funktionelle Entwicklung des duplizierten Cytoglobins zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Aminosäuresequenzen, die Phylogenie sowie die Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* in diversen Teleostei (echte Knochenfische) untersucht. Die hierfür verwendeten Sequenzen wurden entweder direkt von NCBI bezogen oder aus frei zugänglichen bioinformatischen SRA-Transkriptom-Datensätzen ermittelt²⁹ (2.8.1, Anhang Tab. 1).

3.1.1 Sequenzanalysen der duplizierten *Cygb*-Gene deuten auf divergierte *Cygb1*-Sequenzen und konservierte *Cygb2*-Sequenzen in Teleostei hin

Um Ähnlichkeiten und Unterschiede innerhalb der *Cygb1*- und *Cygb2*-Sequenzen zu untersuchen, wurden Aminosäuresequenz-Alignments von diversen echten Knochenfischen (Teleostei) mittels GeneDoc (2.8.2) erstellt. In dem Alignment sind die konservierten Aminosäuren (100 % konserviert: schwarz, 75 % konserviert: dunkelgrau, 50 % konserviert: grau) hervorgehoben und die Globin-Sekundärstruktur ist in Form der α -Helices (Helix A-H) über dem Alignment aufgeführt. Um Ähnlichkeiten zu einem Vorläufer *single copy* *Cygb* zu untersuchen, wurde in beiden Alignments die *Cygb*-Aminosäuresequenz der Australischen Pflughnasenchimäre (*Callorhinchus milii*, Cmi) mitgeführt, die zu den Knorpelfischen (Chondrichthyes) und somit zu einer sehr ursprünglichen Wirbeltiergruppe zählt (Abb. 13, Abb. 14).

Die *Cygb1*-Sequenzen sind im Durchschnitt 177 AS lang, wobei der Stintartige Ayu mit 168 AS die kürzeste und der Dreistachlige Stichling und der Kabeljau mit 189 AS die längsten *Cygb1*-Sequenzen aufzeigen. Die N- und C-Terminale Bereiche der *Cygb1*-Sequenzen zeigen erhebliche Divergenzen auf. Die helikalen Bereiche sind in allen untersuchten *Cygb1*-Sequenzen soweit konserviert, dass in der Sekundärstruktur (Helix A-H) vermutlich die „3-über-3- α -helikale Sandwichstruktur“ ausgebildet wird. Die für die Sauerstoffbindung essentiellen Aminosäuren Phenylalanin an Position CD1 (erste Aminosäure der interhelikalen Region zwischen der C- und der D-Helix) sowie die Histidine an Position E7 und F8 sind in allen *Cygb1*-Sequenzen

²⁹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (15.04.2019)

vorhanden. Durchschnittlich stimmen die *Cygb1*-Sequenzen mit der Vorläufer *single copy* *Cygb*-Sequenz der Australischen Pflugnasenchimäre zu 46 % (\pm 11 %) überein. Die *Cygb1*-Sequenz des Kabeljaus zeigt mit einer Übereinstimmung von nur 40 % die größte Divergenz zu der *Cygb*-Sequenz der Australischen Pflugnasenchimäre auf. Mit 57 % Identität ist die *Cygb1b*-Sequenz der Regenbogenforelle der *Cygb*-Sequenz der Australischen Pflugnasenchimäre am ähnlichsten. Die *Cygb1*-Sequenzen sind untereinander im Durchschnitt zu 58 % (\pm 27 %) identisch. Mit 85 % weisen die *Cygb1*-Sequenzen vom Japanischen Kugelfisch und vom Grünen Kugelfisch die höchste Identität auf. Die größte Divergenz besteht zwischen dem Zebrafisch und dem Stintartigen Ayu (41 %).

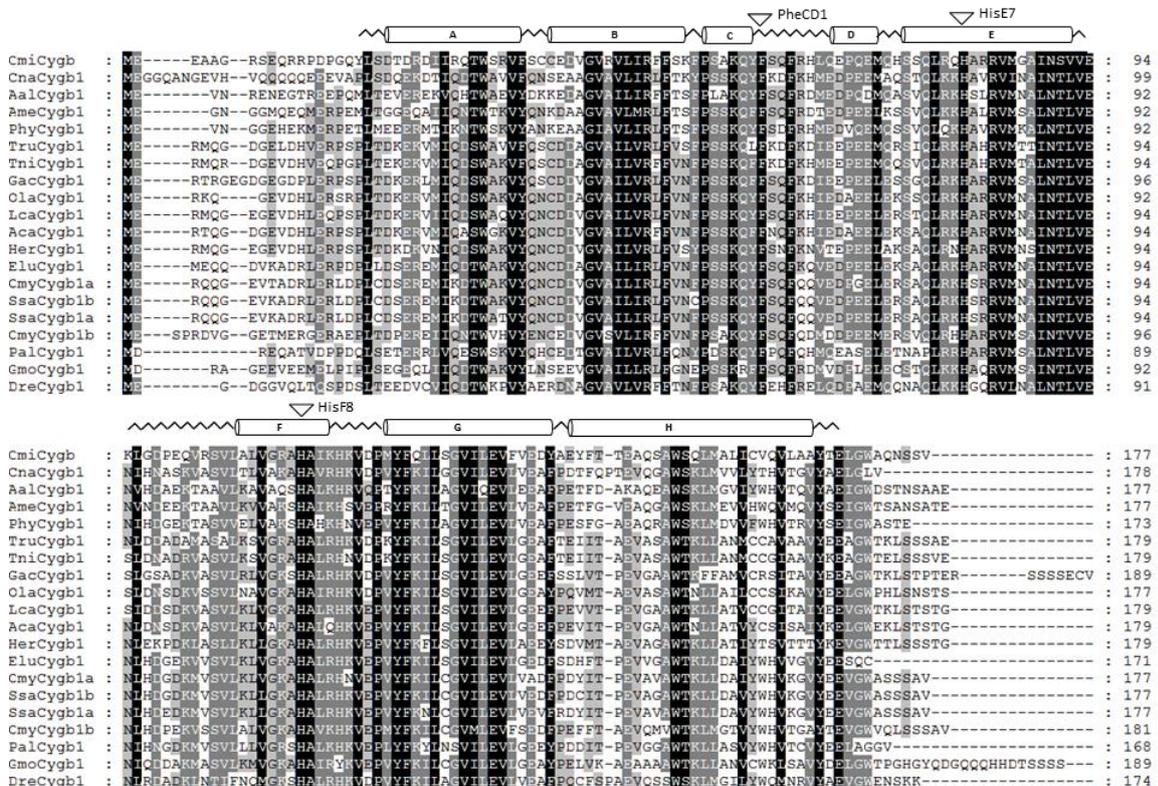


Abbildung 13 Aminosäuresequenz-Alignment von *Cygb1* von diversen echten Knochenfischen (Teleostei)

Dargestellt sind die paralogen *Cygb1*-Aminosäuresequenzen von: *Coilia nasus* (Cna), Weißstirn-Messerfisch (Aal), Cavefish (Ame), Pangasius (Phy), Japanischer Kugelfisch (Tru), Grüner Kugelfisch (Tni), Dreistachliger Stichling (Gac), Medaka (Ola), Barramundi (Lca), *Astatotilapia calliptera* (Aca), Seepferdchen (Her), Hecht (Elu), Regenbogenforelle (Omy), Ayu (Pal), Kabeljau (Gmo), Zebrafisch (Dre). Als *single copy* Referenzsequenz fungiert *Cygb* der Australischen Pflugnasenchimäre (Cmi). Die konservierten Bereiche sind in Schwarz (100 %), Dunkelgrau (75 %) und Grau (50 %) unterlegt. Die α -Helices (Helix A-H) sind über dem Alignment aufgeführt. Die konservierten Aminosäuren Phenylalanin (Phe) an Postion CD1 sowie die Histidine (His) an Postion E7 und F8 sind durch Pfeile markiert.

Die *Cygb2*-Sequenzen sind im Durchschnitt mit 186 As (± 16 AS) länger als die *Cygb1*-Sequenzen. Im Gegensatz zu den *Cygb1*- zeigen die *Cygb2*-Sequenzen ausschließlich erhebliche Divergenzen im N-Terminalen Bereich auf. Die helikalen Bereiche der *Cygb2*-Sequenzen sind konserviert und bilden vermutlich in der Sekundärstruktur (Helix A-H) die „3-über-3- α helikale Sandwichstruktur“ aus. Ebenso wie bei den *Cygb1*-Sequenzen weisen die *Cygb2*-Sequenzen die funktionell wichtigen Aminosäuren Phenylalanin (PheCD1) sowie die Histidine (HisE7, HisF8) auf. Im Durchschnitt stimmen die *Cygb2*-Sequenzen mit der Vorläufer *single copy* *Cygb*-Sequenz der Australischen Pflughnasenchimäre zu 55 % (± 5 %) überein.

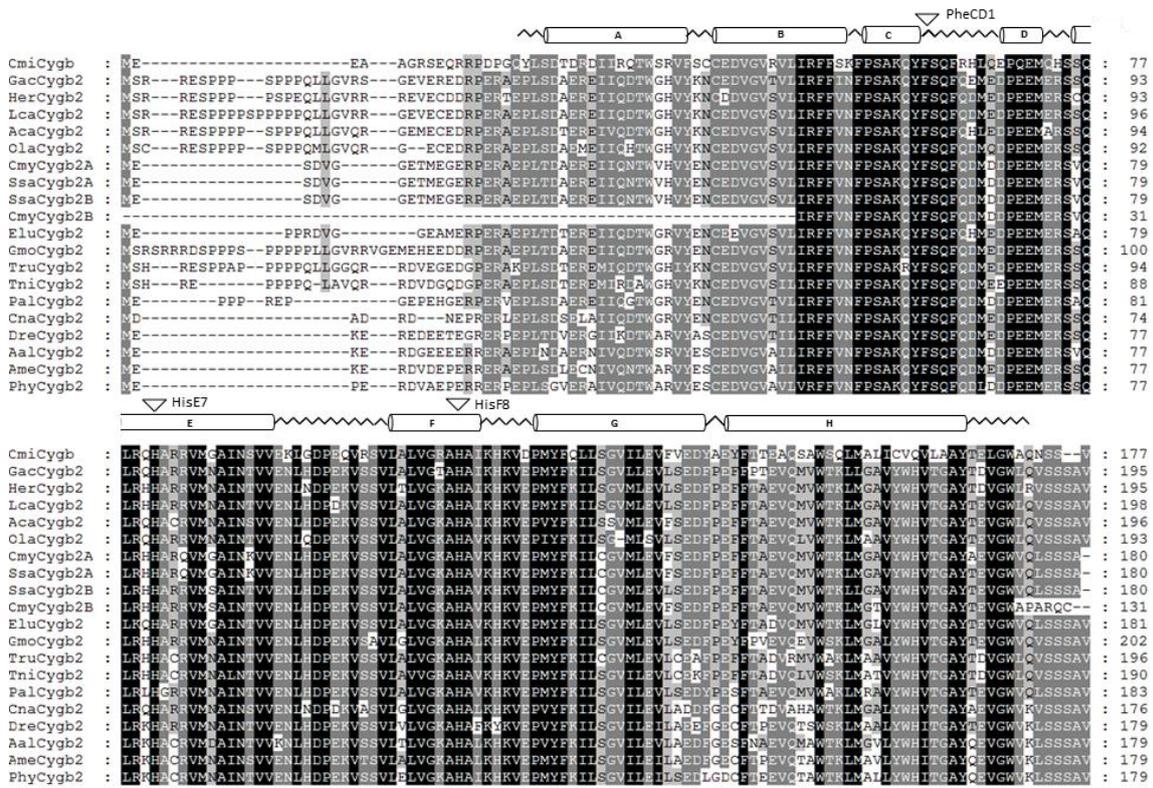


Abbildung 14 Aminosäuresequenz-Alignment von *Cygb2* von diversen echten Knochenfischen (Teleostei)

Dargestellt sind die paralogen *Cygb2*-Aminosäuresequenzen von: Dreistachliger Stichling (Gac), Seepferdchen (Her), Barramundi (Lca), *Astatotilapia calliptera* (Aca), Medaka (Ola), Regenbogenforelle (Omy), Atlantischer Lachs (Ssa), Hecht (Elu), Kabeljau (Gmo), Japanischer Kugelfisch (Tru), Grüner Kugelfisch (Tni), Ayu (Pal), *Coilia nasus* (Cna), Zebrafisch (Dre), Weißstirn-Messerfisch (Aal), Cavefish (Ame), Pangasius (Phy). Als *single copy* Referenzsequenz fungiert *Cygb* der Australischen Pflughnasenchimäre (Cmi). Die konservierten Bereiche sind in Schwarz (100 %), Dunkelgrau (75 %) und Grau (50 %) unterlegt. Die α -Helices (Helix A-H) sind über dem Alignment aufgeführt. Die konservierten Aminosäuren Phenylalanin (Phe) an Postion CD1 sowie die Histidine (His) an Postion E7 und F8 sind durch Pfeile markiert.

Die größten Unterschiede bestehen mit einer Übereinstimmung von 50 % zwischen der *Cygb2*-Sequenz des Japanischen Kugelfisches und der *single copy* *Cygb*-Sequenz der Australischen

Pflugnasenchimäre. Die höchste Übereinstimmung zu der *single copy* *Cygb*-Sequenz zeigen die *Cygb2*-Sequenzen vom Stintartigen Ayu, vom Hecht, vom Pangasius und vom Cavefish (58 %). Untereinander sind die *Cygb2*-Sequenzen im Durchschnitt zu 83 % (± 18 %) identisch. Mit 99 % weisen die *Cygb2a*-Sequenzen der Regenbogenforelle und des Atlantischen Lachses die höchste Identität auf. Die geringste Übereinstimmung zeigen mit 65 % die *Cygb2*-Sequenzen von: Zebrafisch und *Astatotilapia calliptera*, Zebrafisch und Japanischer Kugelfisch, Pangasius und Medaka, Japanischer Kugelfisch und *Coilia nasus*, Pangasius und Weißstirn-Messerfisch.

Ein weiteres kleines viertes Exon, was bisher nur bei *Cygb*-Sequenzen von Säugetieren gefunden wurde (Burmester et al. 2002), fehlt in allen *Cygb1*- und *Cygb2*-Sequenzen der Teleostei. Das vierte C-Terminale Exon innerhalb der *Cygb*-Gene ist wahrscheinlich auf ein säugetierspezifisches Addition zurückzuführen (Burmester et al. 2002; Fuchs et al. 2005).

3.1.2 Phylogenetische Untersuchungen der duplizierten *Cygb*-Gene zeigen eine schnellere evolutionäre Entwicklung von *Cygb1* auf

Um die Entwicklung und phylogenetischen Verhältnisse von *Cygb1* und *Cygb2* innerhalb der Teleostei zu untersuchen, wurde, unter Verwendung von MrBayes (2.8.3), ein Stammbaum erstellt (Abb. 15). Die hierfür verwendeten *Cygb1*- und *Cygb2*-Sequenzen sind die aus den oben aufgeführten Alignments (Abb. 13, Abb. 14). Als Außengruppe wurde die Australische Pflugnasenchimäre verwendet, die zu den Knorpelfischen (Chondrichthyes) gehört und ein *single copy* *Cygb*-Gen besitzt. Der aus den Analysen resultierende Stammbaum ist in Abbildung 15 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass *Cygb1* und *Cygb2* zwei monophyletische Schwesterngruppen bilden. Diese zwei jeweils monophyletischen Gruppen von paralogenen Genen haben sich nach der tsWGD (siehe Stern in Abb. 15) von den ancestralen Kopien der restlichen Strahlenflosser getrennt. Wie bereits in vorherigen Studien beschrieben (Gallagher und Macqueen 2017) weisen die Elopomorpha, obwohl sie zu den Teleostei gehören, nur eine *Cygb*-Sequenz auf (hier durch den Europäischen Aal und den Japanischen Aal repräsentiert). Die *single copy* *Cygb*-Sequenzen der Elopomorpha stehen in einem monophyletischen Verhältnis zueinander. Ferner lässt sich anhand des Stammbaums erkennen, dass die Substitutionsrate der *Cygb1*-Sequenzen wesentlich höher ist als die der *Cygb2*-Sequenzen und die der *single copy* *Cygb*-Sequenz. Die hohe Substitutionsrate von *Cygb1* deckt sich mit den stark divergierenden *Cygb1*-Sequenzen aus dem oben aufgeführten Alignment (Abb. 13).

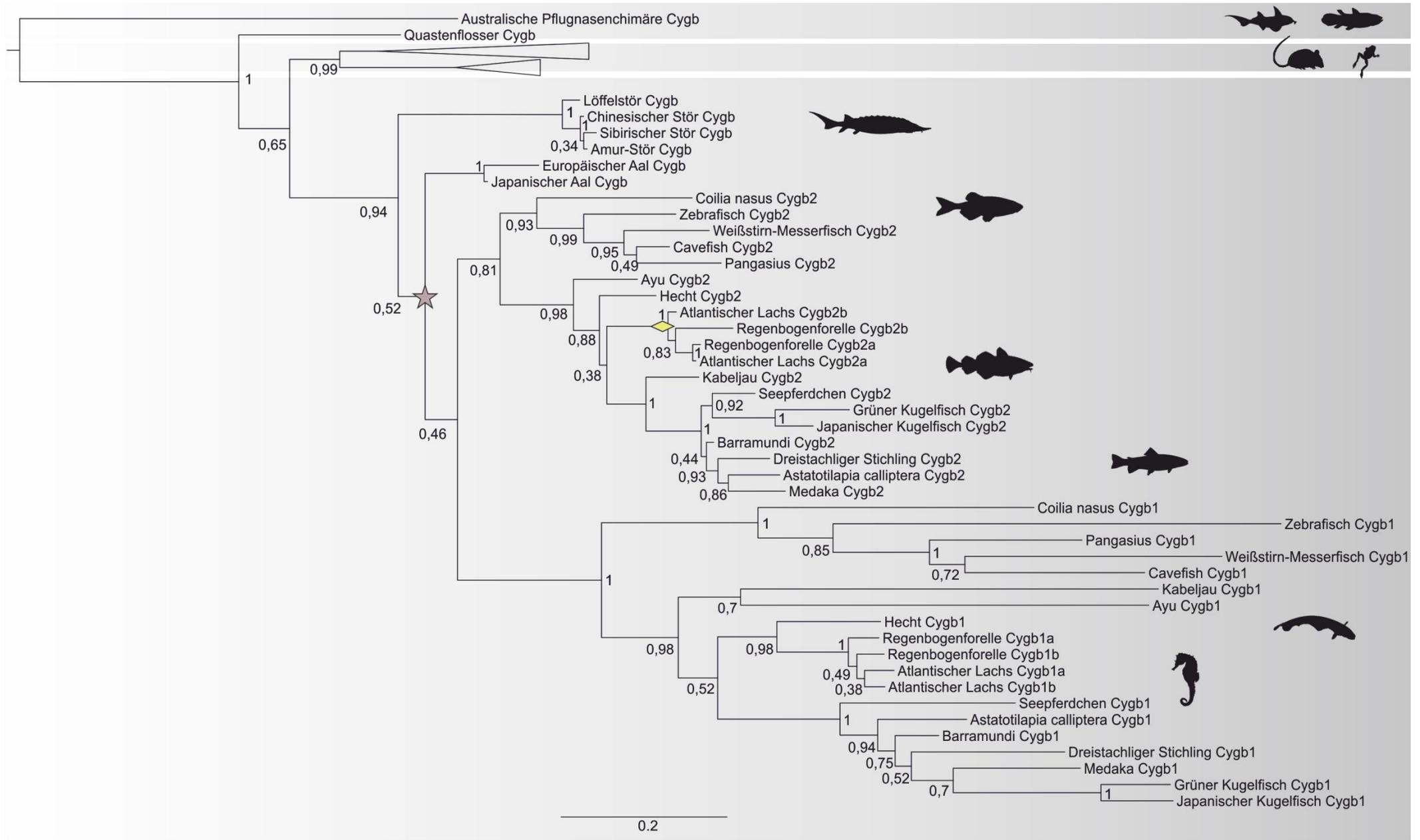


Abbildung 15 Phylogenie von *Cygb1* und *Cygb2* in Teleostei

Dargestellt sind die phylogenetischen Verhältnisse von *Cygb1* und *Cygb2* innerhalb der Teleostei. *Cygb1* und *Cygb2* bilden zwei monophyletische Schwesterngruppen. Die Berechnung des Stammbaums wurde mittels Bayes'scher Analyse unter Verwendung des Dayhoff+I+G-Modells durchgeführt. Es wurden 5 Millionen Generationen durchlaufen, von denen die ersten 25 % nach Beendigung eliminiert wurden. Als Außengruppe dient die *single copy* *Cygb*-Sequenz der Australischen Pflugnasechimäre. Der unten aufgeführte Balken repräsentiert 0,2 Substitutionen pro Aminosäureposition. Die Kladen der Reptilien und der Säugetiere sind kollabiert dargestellt. Markiert sind die tsWGD (★) sowie die ssWGD (◊).

3.1.3 Genexpressionsanalysen in Teleostei zeigen ein diverses Expressionsmuster von *Cygb1* und ein konserviertes Expressionsmuster für *Cygb2* auf

Um zu untersuchen, ob die Genexpression und somit möglicherweise die Funktionen von *Cygb1* und *Cygb2* in den Teleostei konserviert sind, wurden Genexpressionsanalysen mittels RNA-Mapping durchgeführt (2.8.4, Abb. 16).

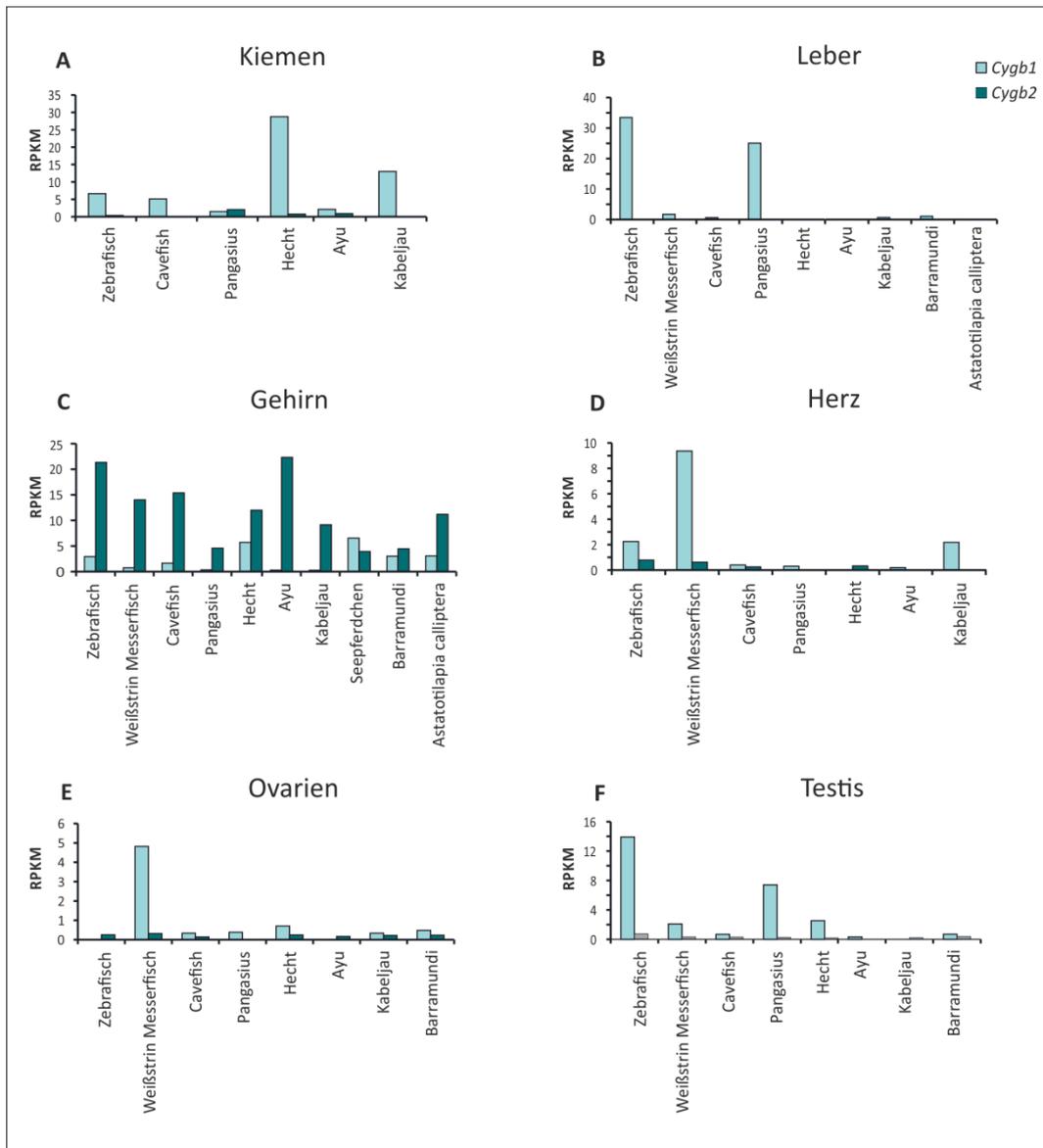


Abbildung 16 Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* in diversen Teleostei in verschiedenen Geweben

Dargestellt ist die Genexpression des duplizierten *Cygb*-Gens in diversen Teleostei in den Kiemen, der Leber, dem Gehirn, dem Herzen, den Ovarien und den Testis. Die Stärke der Expression ist in Form des RPKM-Wertes (*reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) angegeben. Das Mapping wurde mit der CLC-Workbench durchgeführt und die Reads mussten mit 90 % ihrer Länge und ihrer Sequenz mit der Referenzsequenz übereinstimmen. Die verwendeten SRA-Datensätze sind im Anhang in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Genexpression wurde in der Leber, dem Gehirn, dem Herzen, den Ovarien und den Testis in diversen Teleostei untersucht. Die Stärke der Expression ist in RPKM (*Reads per kilobase of exon model per million mapped Reads*) angegeben.

Die Analyse der Genexpression des duplizierten *Cygb*-Gens in unterschiedlichen Teleostei zeigt ein deutlich konserviertes Expressionsmuster von *Cygb2* auf. In allen untersuchten Teleostei ist *Cygb2* am stärksten im Gehirn exprimiert. Im Stintartigen Ayu und im Zebrafisch ist die Expression von *Cygb2* mit einem RPKM von 21,8 ($\pm 0,5$) am stärksten. Im Seepferdchen ist die Expression mit einem RPKM-Wert von 3,9 am geringsten. *Cygb1* hingegen zeigt ein variables Expressionsmuster auf, welches sich abhängig von der jeweiligen Fischart und dem Gewebe unterscheidet. Verstärkt exprimiert wird *Cygb1* in den Kiemen vom Hecht (RPKM von 28,8), in der Leber vom Zebrafisch (RPKM von 33,5) und in der Leber vom Pangasius (RPKM 25,1). Im Herzen vom Weißstirn-Messerfisch (RPKM von 9,4), in den Testis vom Zebrafisch (RPKM von 13,9) und in den Ovarien vom Weißstirn-Messerfisch (RPKM von 4,8) ist ebenfalls eine deutliche Expression messbar. Durch die *salmonid-specific* WGD ist es in Lachsartigen (Salmonidae) zu einer weiteren Verdopplung der *Cygb*-Kopien gekommen. Hierbei sind zwei Kopien von *Cygb1* (*Cygb1a* und *Cygb1b*) und zwei Kopien von *Cygb2* (*Cygb2a* und *Cygb2b*) entstanden, die unterschiedliche Expressionsmuster aufzeigen (Abb. 17).

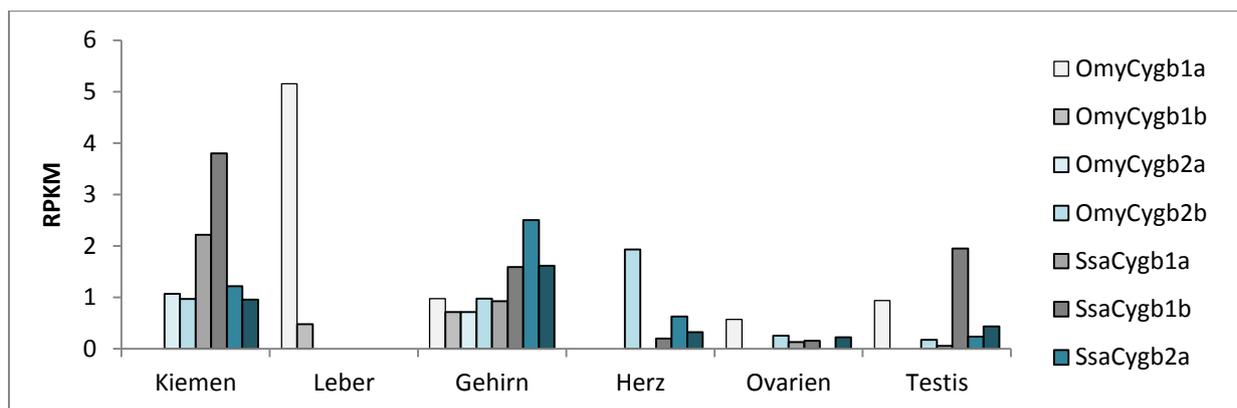


Abbildung 17 Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* in Lachsartigen (Salmonidae)

Dargestellt ist die Genexpression der multiplen *Cygb*-Kopien in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*, Omy) und im Atlantischen Lachs (Ssa). Untersucht wurde die Genexpression in den Kiemen, der Leber, dem Gehirn, dem Herzen, den Ovarien und den Testis. Die Stärke der Expression ist in Form des RPKM-Wertes (*Reads per kilobase of exon model per million mapped Reads*) angegeben. Das Mapping wurde mit der CLC-Workbench durchgeführt und die Reads mussten mit 90 % ihrer Länge und ihrer Sequenz mit der Referenzsequenz übereinstimmen. Die verwendeten SRA-Datensätze sind im Anhang in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Genexpression der multiplen *Cygb*-Gene in Lachsartigen ist insgesamt sehr gering. Die höchste Genexpression weist *OmyCygb1a* (Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss*, Omy) in der Leber mit einem RPKM von 5,2 auf. Im Gehirn werden alle multiplen *Cygb*-Gene sowohl von der Regenbogenforelle als auch vom Atlantischen Lachs exprimiert. Die Expression ist auch hier sehr gering und *Cygb2a* des Atlantischen Lachses (*Salmo salar*, Ssa) zeigt mit einem RPKM von 2,5 die höchste Genexpression auf. Im Herzen, den Ovarien und den Testis werden nicht alle der multiplen *Cygb*-Gene exprimiert und die, die hier exprimiert werden zeigen einen sehr geringen RPKM-Wert auf. In den Kiemen werden, mit Ausnahme von *OmyCygb1a*, alle multiplen *Cygb*-Gene exprimiert. Die höchste Genexpression weist hier *SsaCygb1b* mit einem RPKM von 3,8 auf.

3.2 Untersuchungen zur Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* im Zebrafisch (*Danio rerio*)

Obwohl es bereits einige Untersuchungen zur Genexpression und zur Kinetik von *Cygb1* und *Cygb2* gibt (Fuchs et al. 2005; Tiedke et al. 2011; Corti et al. 2016a), ist die Lokalisation des duplizierten *Cygb*-Gens noch nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* im Gehirn (Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20) und in der Leber (Abb. 22, Abb. 23) von *Danio rerio* untersucht, da dies die Gewebe mit der stärksten Expression sind. Hierfür wurden sowohl *in situ*-Hybridisierungen als auch immunhistochemische Färbungen vorgenommen. Die Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* in *Danio rerio*-Embryonen wurde mittels *whole mount in situ*-Hybridisierung untersucht (Abb. 24, Abb. 25).

3.2.1 Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* im Gehirn vom Zebrafisch (*Danio rerio*)

Für die Lokalisationsuntersuchung von *Cygb1* und *Cygb2* im Gehirn von *Danio rerio* mittels *in situ*-Hybridisierung wurden spezifische Sonden im 3'UTR Bereich angefertigt (Anhang Abb. 1). Als Kontrolle fungierte die Kontrollsonde aus dem „Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)“. Mit Hilfe eines Dot Blots (Anhang Abb. 2) wurde die Verdünnung ermittelt (1:1000), in der die Sonden eingesetzt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 zusammengestellt.

Cygb1 und *Cygb2* zeigen beide ein deutliches Signal im Gehirn von *Danio rerio*. Die duplizierten *Cygb*-Gene sind verstärkt in der periventricularen grauen Zone des Tectum Opticums (PGZ) lokalisiert. Darüber hinaus zeigen sich, sowohl für *Cygb1* als auch für *Cygb2*, deutliche Signale in einzelnen Zellen des Tectum Opticums (TeO). Die Hoechst-Färbung dient der Lokalisation von

Zellkernen. Eine Überlagerung der Bilder lässt eine cytoplasmatische Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* vermuten, ist jedoch nicht eindeutig. Um die genaue zelluläre Lokalisation zu bestimmen und eine Korrelation der mRNA und der Proteine zu untersuchen, wurden daraufhin immunhistochemische Bilder angefertigt (Abb. 19, Abb. 20).

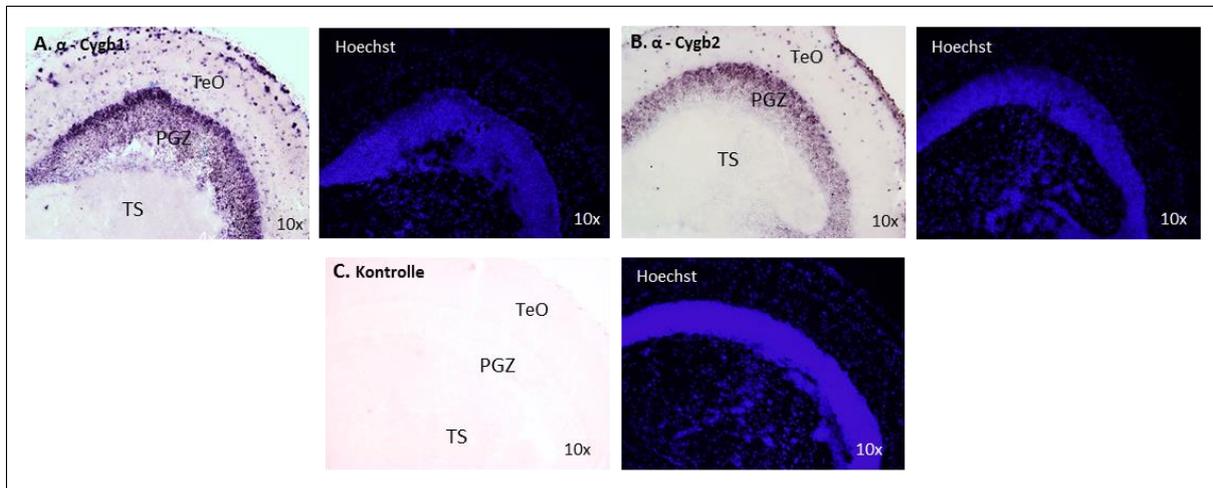


Abbildung 18 *in situ*-Hybridisierung von *Cygb1* und *Cygb2* im Gehirn von *Danio rerio*

Dargestellt sind *in situ*-Hybridisierungen im Bereich des Tectum Opticum von (A) *Cygb1*, (B) *Cygb2* und (C) einer Negativkontrolle. Zu erkennen ist das Tectum Opticum (TeO), die periventriculäre graue Zone des Tectum Opticum (PGZ) und das torus semicircularis (TS). Die spezifischen *Cygb1*- und *Cygb2*-Sonden wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Als Kontrolle fungiert eine Kontrollsonde aus dem „Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)“, die ebenfalls in einem Verhältnis von 1:1000 eingesetzt wurde.

Die Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* mittels Immunhistochemie wurde mit eigens generierten Antikörpern vorgenommen (2.3.6). Bei der Negativkontrolle wurde auf die Zugabe eines Erstantikörpers verzichtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 und 21 zusammengefasst.

Die immunhistochemischen Aufnahmen zeigen sowohl für *Cygb1* als auch für *Cygb2* deutliche Signale in der periventriculären grauen Zone des Tectum Opticum (PGZ), dem Tectum Opticum (TeO) und, im Gegensatz zu den *in situ*-Hybridisierungen, auch im Bereich des Torus Semicircularis (TS). Diese klaren Signale von *Cygb1* und *Cygb2* deuteten auf eine Lokalisation in Neuronen hin. Bei Überlagerung der Hoechst-Färbung und der *Cygb1*- und *Cygb2*-Immunfärbungen (Merge) wird deutlich, dass beide duplizierten *Cygb*-Gene im Cytoplasma der Zellen lokalisiert sind. Darüber hinaus zeigt *Cygb1*, im Gegensatz zu *Cygb2*, ein eindeutiges Signal in Blutgefäßen auf (Abb. 19, BG).

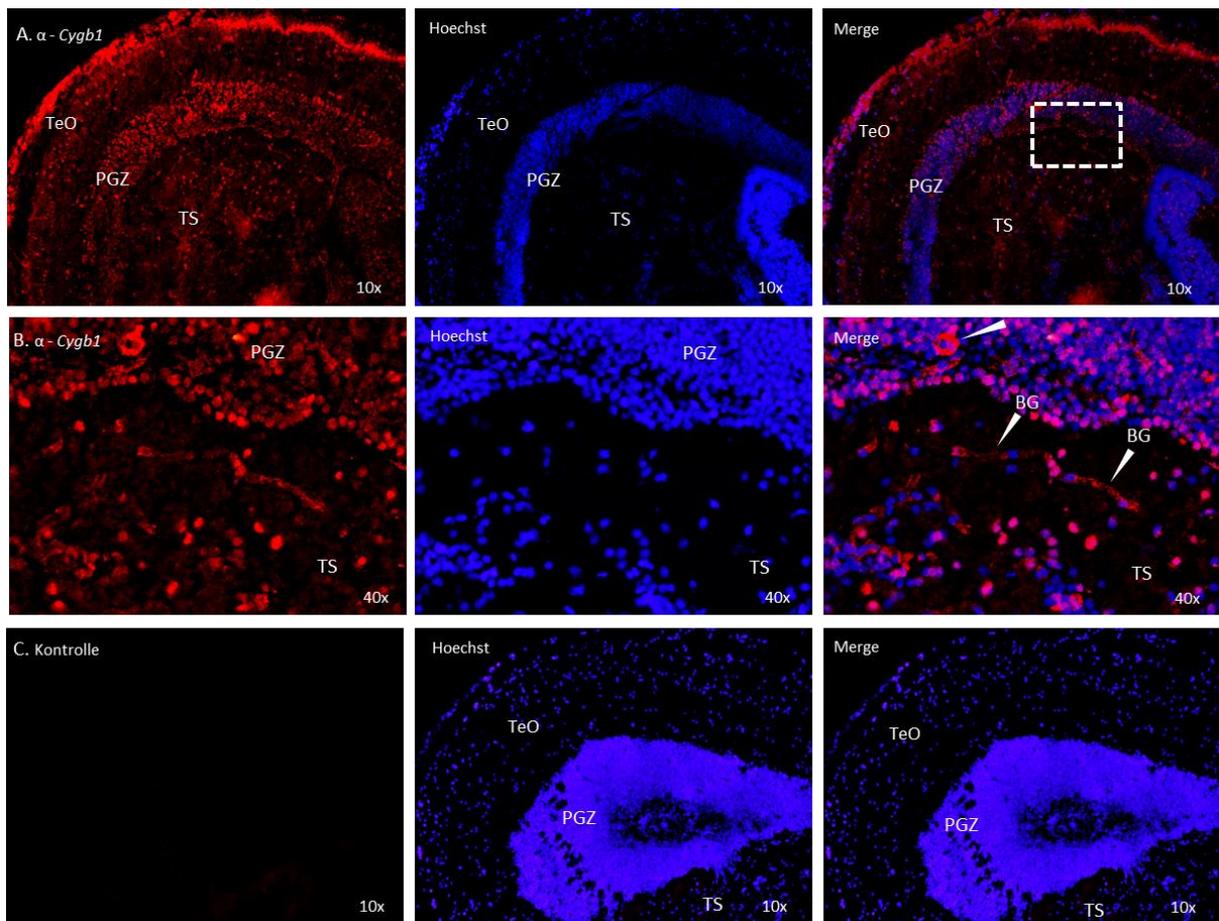


Abbildung 19 Immunhistochemischer Nachweis von *Cygb1* im Gehirn von *Danio rerio*

Dargestellt ist die Immunfärbung von *Cygb1* im Gehirn in den Bereichen des Tectum Opticums (TeO), der periventricularen grauen Zone des Tectum Opticums (PGZ) und des torus semicircularis (TS). Der *Cygb1*-Antikörper wurde selbst generiert und in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Das Signal des *Cygb1*-Antikörpers ist in Rot dargestellt und die Hoechst-Färbung in Blau. **A.** zeigt eine Übersicht in einer 10-fachen Vergrößerung. **B.** zeigt einen Teilbereich der periventricularen grauen Zone des Tectum Opticums (PGZ) und des torus semicircularis (TS) in einer 40-fachen Vergrößerung. Die cytoplasmatische Lokalisation in einem Neuron und einem Blutgefäß (BG) sind in der gemergten 40-fachen Vergrößerung durch Pfeile markiert. **C.** zeigt die Kontroll-Färbung, bei der kein Erstantikörper verwendet wurde.

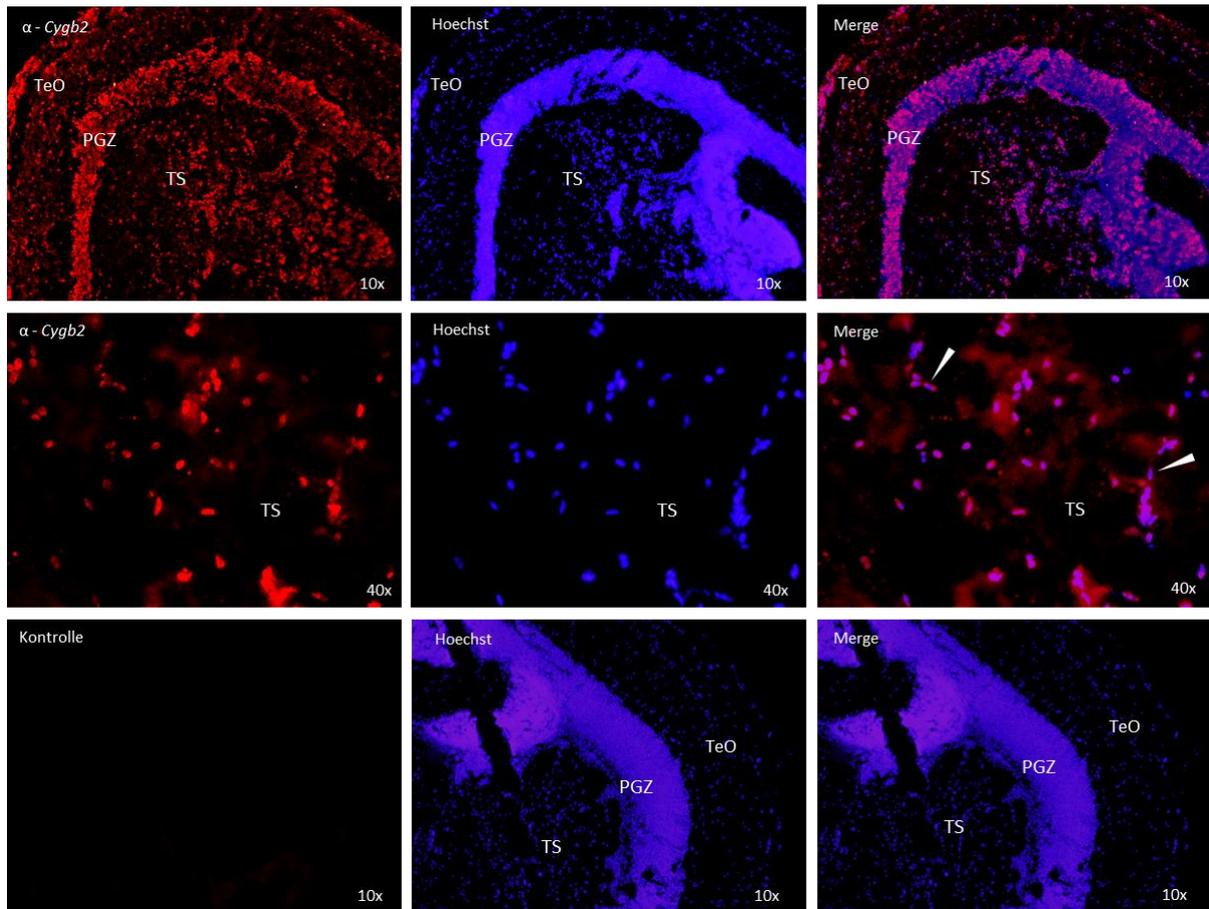


Abbildung 20 Immunhistochemischer Nachweis von *Cygb2* im Gehirn von *Danio rerio*

Dargestellt ist die Immunfärbung von *Cygb2* im Gehirn in den Bereichen des Tectum Opticums (TeO), der periventricularen grauen Zone des Tectum Opticums (PGZ) und des torus semicircularis (TS). Der *Cygb2*-Antikörper wurde selbst generiert und in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Das Signal des *Cygb2*-Antikörpers ist in Rot dargestellt und die Hoechst-Färbung in Blau. **A.** zeigt eine Übersicht in einer 10-fachen Vergrößerung. **B.** zeigt einen Teilbereich der periventricularen grauen Zone des Tectum Opticums (PGZ) und des torus semicircularis (TS) in einer 40-fachen Vergrößerung. Die cytoplasmatische Lokalisation in verschiedenen Neuronen ist in der gemergten 40-fachen Vergrößerung durch Pfeile markiert. **C.** zeigt die Kontrollfärbung, bei der kein Erstantikörper verwendet wurde.

3.2.1.1 Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* in Neuronen und Gliazellen

Um ein besseres Verständnis für die genauen Zelltypen, in denen *Cygb1* und *Cygb2* lokalisiert sind, zu erhalten, wurde die Expression in verschiedenen Neuronen und Gliazellen untersucht. Hierfür wurden SRA-Datensätze (Anhang Tab. 3) verwendet und die Stärke der Expression wurde in RPKM-Werten (*Reads per kilobase of exon model per million mapped Reads*) bestimmt (Abb. 21).

Die Expression der beiden duplizierten *Cygb*-Gene ist in Gliazellen sehr gering. *Cygb2* wird in allen untersuchten Gliazellen (Müller-Gliazellen, Micro-Gliazellen, Radial-Gliazellen) stärker exprimiert als *Cygb1*. Mit einem RPKM-Wert von 2,6 ist die Expression von *Cygb2* in den Müller-Gliazellen und den Radial-Gliazellen (7 dpf) am höchsten. Die Expressionsstärke von *Cygb1* und *Cygb2* in Neuronen ist in den verschiedenen neuronalen Subpopulationen sehr variabel. *Cygb1* wird verstärkt in Spinal-Neuronen (RPKM=38,9) und *Cygb2* in Intestinal-Neuronen (RPKM=84,5) exprimiert. Diese Werte bestätigen das Vorhandensein der duplizierten *Cygb*-Gene in Neuronen, zeigen aber auch auf, dass *Cygb1* und *Cygb2* in unterschiedlichen neuronalen Subpopulationen exprimiert werden (Abb. 21).

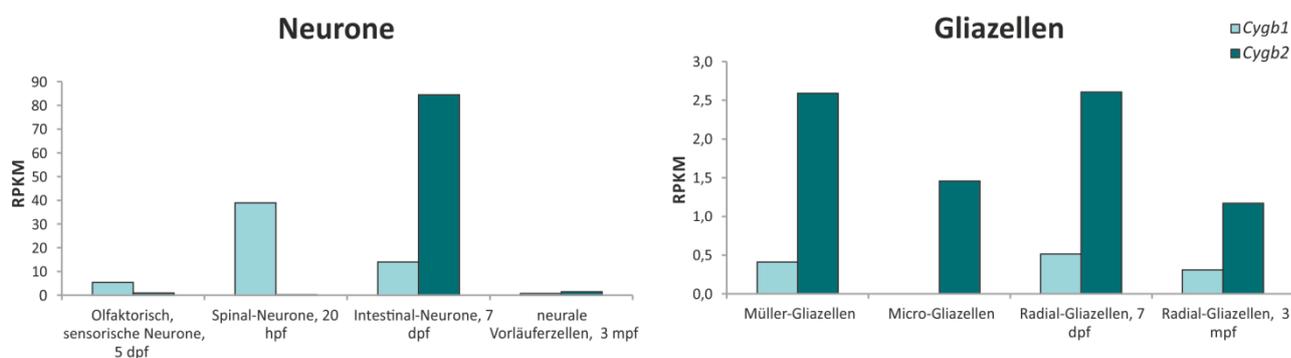


Abbildung 21 Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* in verschiedenen Neuronen und Gliazellen

Dargestellt ist die Genexpression der duplizierten *Cygb*-Gene in unterschiedlichen Neuronen und Gliazellen. Dpf steht für *days post fertilization*, hpf steht für *hours post fertilization* und mpf steht für *months post fertilization*. Die Stärke der Expression ist in Form des RPKM-Wertes (*Reads per kilobase of exon model per million mapped Reads*) angegeben. Das Mapping wurde mit der CLC-Workbench durchgeführt und die Reads mussten mit 90 % ihrer Länge und ihrer Sequenz mit der Referenzsequenz übereinstimmen. Die verwendeten SRA-Datensätze sind im Anhang in Tabelle 3 aufgeführt.

3.2.2 Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* in der Leber von *Danio rerio*

Neben der Lokalisation im Gehirn wurde die Lokalisation in der Leber untersucht, da *Cygb1* hier die stärkste Expression aufweist. Für die Lokalisationsuntersuchung der duplizierten *Cygb*-Gene mittels *in situ*-Hybridisierung wurden ebenfalls die spezifischen Sonden im 3' UTR Bereich verwendet (Anhang Abb. 1). Als Kontrolle fungierte abermals die Kontrollsonde aus dem „Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)“. Die Sonden wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 zusammengestellt.

Zu erkennen ist ein deutliches Signal von *Cygb1* in den Hepatozyten (Hp). *Cygb2* zeigt eher ein schwaches Signal. Beide duplizierten *Cygb*-Gene scheinen jedoch in Hepatozyten (Hp) lokalisiert zu sein. Anhand der hier gezeigten *in situ*-Hybridisierungen lässt sich allerdings nicht eindeutig feststellen, ob die duplizierten *Cygb*-Gene im Nukleus oder im Cytoplasma lokalisiert sind. Um die genaue Lokalisation und eine Korrelation der mRNA und der Proteine zu untersuchen, wurden für die Leber ebenfalls Immunfärbungen vorgenommen (Abb. 23).

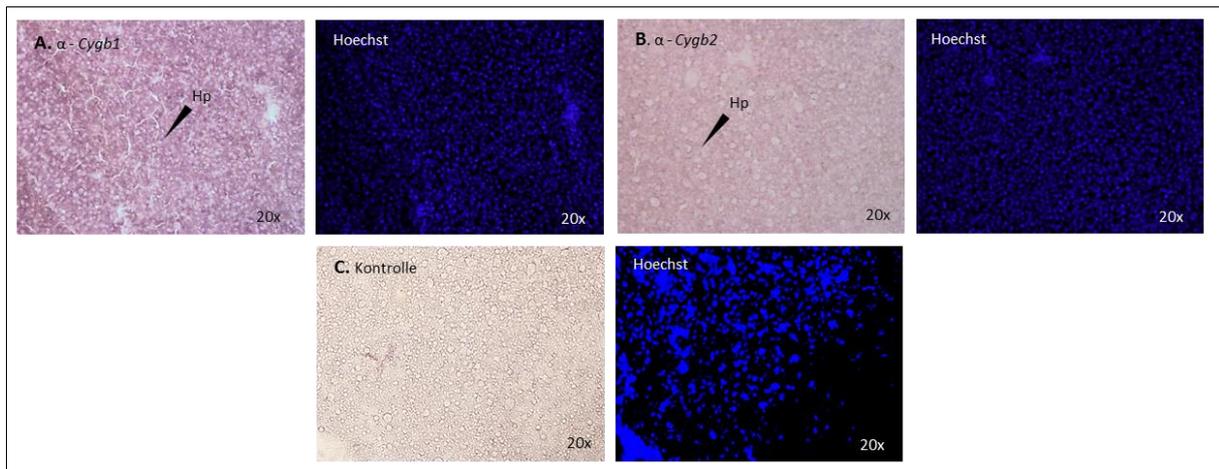


Abbildung 22 *in situ*-Hybridisierung von *Cygb1* und *Cygb2* in der Leber von *Danio rerio*

Dargestellt sind *in situ*-Hybridisierungen in der Leber von (A) *Cygb1*, (B) *Cygb2* und (C) einer Negativkontrolle. Zu sehen sind Hepatozyten (Hp). Die spezifischen *Cygb1*- und *Cygb2*-Sonden wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Als Kontrolle fungiert eine Kontrollsonde aus dem „Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)“, die ebenfalls in einem Verhältnis von 1:1000 eingesetzt wurde.

Die Immunfärbungen wurden, wie im Gehirn, mit eigens generierten Antikörpern durchgeführt (2.3.6). Die Negativkontrolle wurde ohne die Zugabe eines Erstantikörpers vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 zusammengefasst. Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl *Cygb1* als auch von *Cygb2* in Hepatozyten (Hp) der Leber lokalisiert sind. Die Antikörperfärbungen der duplizierten *Cygb*-Gene weisen eine verstärkte Färbung in cytoplasmatischen Bereichen der Zellen auf. Bei der Überlagerung der Immunfärbungen und der Hoechst-Färbung wird deutlich, dass *Cygb1* und *Cygb2* im Cytoplasma der Zellen lokalisiert sind, da der Zellkern ausgespart bleibt.

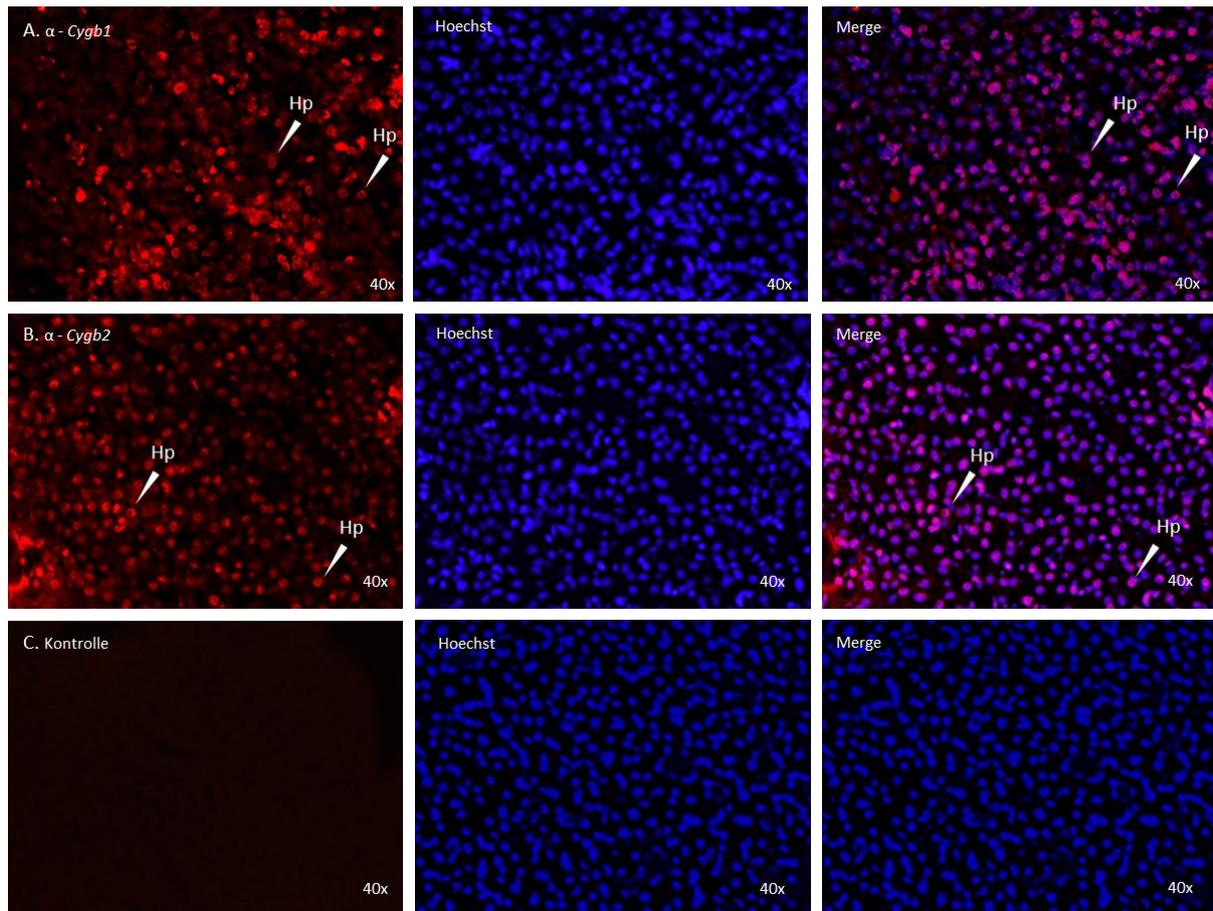


Abbildung 23 Immunhistochemischer Nachweis von *Cygb1* und *Cygb2* in der Leber von *Danio rerio*

Dargestellt ist die Immunfärbung von *Cygb1* und *Cygb2* in Hepatozyten (Hp) in der Leber von *Danio rerio*. Die *Cygb1*- und *Cygb2*-Antikörper wurden eigens generiert und in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Das Signal der *Cygb1*- und *Cygb2*-Antikörper ist in Rot dargestellt und die Hoechst-Färbung in Blau. **A.** zeigt die Immunfärbung von *Cygb1*, **B.** zeigt die Immunfärbung von *Cygb2* und **C.** zeigt die Kontroll-Färbung, bei der kein Erstantikörper verwendet wurde.

3.2.3 mRNA-Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* in *Danio rerio* Embryonen

In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ab 31 hpf (*hours post fertilization*) die Expression von *Cygb1* deutlich ansteigt, wohingegen die Expression von *Cygb2* nur allmählich zunimmt. Während die Expression in der Entwicklung von *Danio rerio* Embryonen bereits gut beschrieben ist (Tiedke et al. 2011), ist die Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* in Embryonen noch unklar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Lokalisation der duplizierten *Cygb*-Gene im *Danio rerio* Embryonen untersucht. Hierfür wurden *whole mount in situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden angefertigt (Anhang Abb. 1).



Abbildung 24 *In situ*-Hybridisierung von *Cygb1* und *Cygb2* in *Danio rerio* Embryonen

Dargestellt sind *whole mount in situ*-Hybridisierungen in *Danio rerio* Embryonen nach 48 hpf, 72 hpf, 96 hpf und 120 hpf (hpf=*hours post fertilization*). Von den spezifischen *Cygb1*- und *Cygb2*-Sonden wurden jeweils ~50 ng eingesetzt. Als Kontrolle fungiert eine Kontrollsonde aus dem „Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)“, die in einer Verdünnung von 1:660 eingesetzt wurde. **A.** zeigt die Kontrollfärbung, **B.** zeigt die *in situ*-Hybridisierung von *Cygb1* und **C.** zeigt die *in situ*-Hybridisierung von *Cygb2*. Do steht für *developing organs*.

Cygb1 zeigt ab 48 hpf ein deutliches Signal im Kopfbereich des *Danio rerio* Embryos (Abb. 24 und Abb. 25). Die Lokalisation im Kopfbereich erstreckt sich über den gesamten untersuchten Zeitraum. Darüber hinaus ist *Cygb1* in 48 hpf alten Embryonen im Bereich der sich entwickelnden Organe lokalisiert (Do). In der 10-fach vergrößerten Ansicht lässt sich erkennen, dass *Cygb1* in der inneren Plexiform-Schicht (IPL), in der Photorezeptor-Schicht (PCL), im Mesencephalon (MB) und im Rhombencephalon (HB) lokalisiert ist (Abb. 25). *Cygb2* zeigt insgesamt ein schwächeres Signal. Im 48 hpf Embryo ist kein *Cygb2*-Signal detektierbar. Ab 72 hpf ist *Cygb2* im primordialen Kanal des Rhombencephalons (PHBC), in der Anlage des Ohres (Ea), im Neurocoel (Nc) und in der Leber (Li) lokalisiert (Abb. 25). Diese Lokalisation bleibt bis 120 hpf beständig.

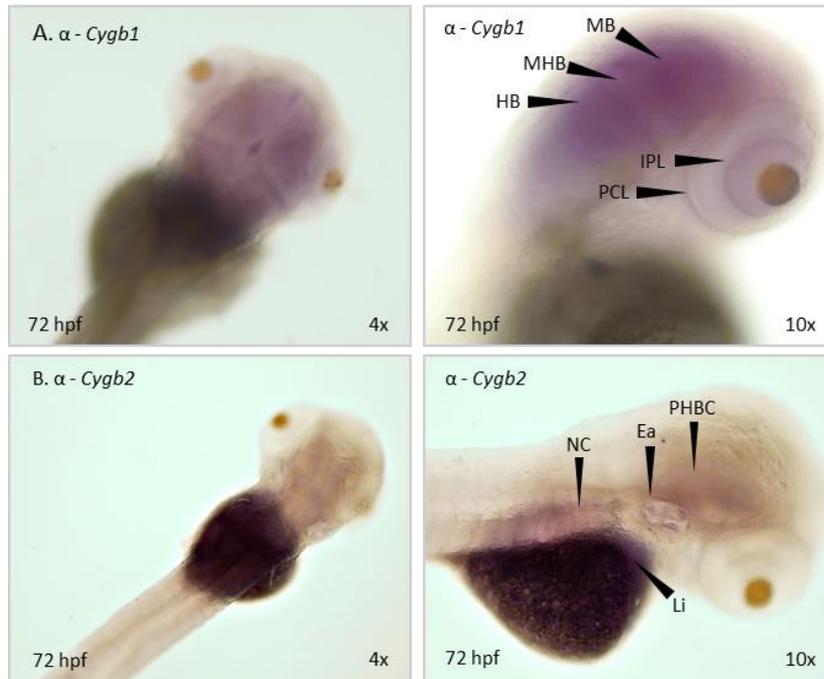


Abbildung 25 *in situ*-Hybridisierung von *Cygb1* und *Cygb2* in 72 hpf alten *Danio rerio* Embryonen

Dargestellt sind *whole mount in situ*-Hybridisierungen in *Danio rerio* Embryonen nach 72 hpf (hpf=*hours post fertilization*). Von den spezifischen *Cygb1*- und *Cygb2*-Sonden wurden jeweils ~50 ng eingesetzt. Als Kontrolle fungiert eine Kontrollsonde aus dem „Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)“, die in einer Verdünnung von 1:660 eingesetzt wurde. **A.** zeigt die *in situ*-Hybridisierung von *Cygb1* und **B.** zeigt die *in situ*-Hybridisierung von *Cygb2*. *Cygb1* ist im 72 hpf alten Embryonen in der inneren Plexiform-Schicht (*inner plexiform layer*, IPL), in der Photorezeptor-Schicht (*photoreceptor cell layer*, PCL), im Mesencephalon (*mid brain*, MB) und im Rhombencephalon (*hind brain*, HB) lokalisiert. *Cygb2* zeigt eine Lokalisation im primordialen Kanal des Rhombencephalons (*primordial hindbrain channel*, PHBC), in der Anlage des Ohres (*ear*, Ea), im Neurocoel (*neurocoel*, Nc) und in der Leber (*liver*, Li).

3.3 Funktionsuntersuchung von *Cygb1* und *Cygb2* mittels verschiedener Stressversuche

Während die Expression und die kinetischen Eigenschaften der duplizierten *Cygb*-Gene bereits in einigen Studien untersucht wurden (Fuchs et al. 2005; Tiedke et al. 2011; Corti et al. 2016a), ist die Funktion zum jetzigen Zeitpunkt weitestgehend unklar. Im Zebrafisch wurden bereits Hypoxie-Experimente durchgeführt, die eine leichte Hochregulation der Expression von *Cygb1* und *Cygb2* aufzeigen. Die Auswertung wurde in der beschriebenen Studie im gesamten Fisch durchgeführt, was Rückschlüsse auf gewebespezifische Regulationen und Funktionen ausschließt (Roesner et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von *Cygb1* und *Cygb2* als Reaktion auf verschiedene Stressoren in einzelnen Geweben untersucht. Hierfür wurden Hypoxie- und ROS-Stress-Versuche durchgeführt, da diese auch im natürlichen Habitat

der Zebrafische auftreten können. Zebrafische sind durch morphologische und physiologische Anpassungen an diese Stressoren adaptiert (Nikinmaa 2002; Nikinmaa und Rees 2005; Sandrini et al. 2009; Ormerod et al. 2010; Tiedke et al. 2013), wodurch die Funktionen der involvierten Gene gut untersucht werden können. Innerhalb der Versuche wurde die Genexpression von verschiedenen Stress-Markergenen, von den duplizierten *Cygb*-Genen und von Myoglobin analysiert. Da die Funktionen von Myoglobin weitestgehend untersucht sind, fungiert es als Positiv-Kontrolle. Die Daten wurden nicht auf Referenzgene normalisiert, da die getesteten Referenzgene starke Expressions-Schwankungen zwischen den Geweben und den unterschiedlichen physiologischen Zuständen zeigten (Daten hier nicht gezeigt). Die Genexpression der duplizierten *Cygb*-Gene sowie der Referenzgene wurden auf 1 µg Gesamt-RNA normalisiert.

3.3.1 Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* unter Hypoxie-Bedingungen

Für die Hypoxie-Versuche wurden sechs männliche Zebrafische für 48 Stunden bei einer Sauerstoffkonzentration von 2 kPa gehalten. Die Männchen im Kontrollbecken wurden für 48 Stunden unter Normoxie-Bedingungen gehalten, was einer Sauerstoffkonzentration von ungefähr 18 kPa entspricht. Der Versuch wurde in 25-Liter-Aquarien bei 22,5°C durchgeführt und die Fische wurden während des Versuches nicht gefüttert. Die Auswertung der Genexpression wurde mittels qRT-PCR vorgenommen. Als Stress-Markergene wurden Enolase 1a (*Eno1a*) und das Hitzeschockprotein 27 (*Hsp27*) verwendet.

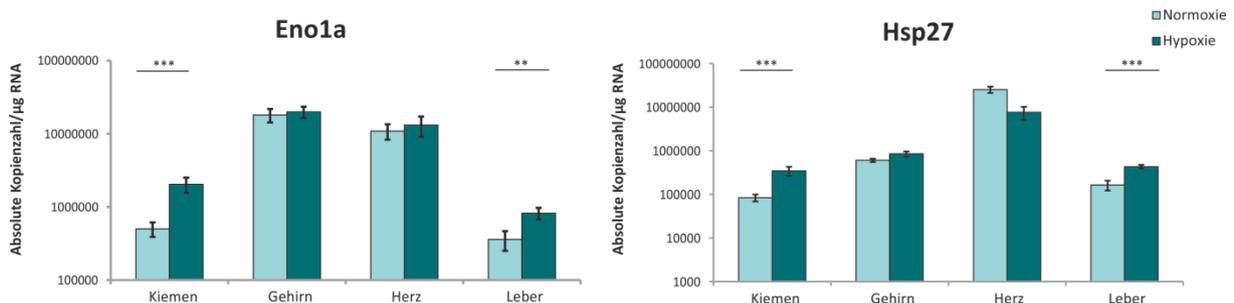


Abbildung 26 Genexpression von *Eno1a* und *Hsp27* bei Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen

Dargestellt sind die absoluten Kopienzahlen von Enolase 1a (*Eno1a*) und dem Hitzeschockprotein 27 (*Hsp27*) unter Normoxie (~19 kPa) und nach 48 Stunden Hypoxie (2 kPa). *Eno1a* ist ein Glykolyse-Enzym und spiegelt die Umstellung vom aeroben zu anaeroben Metabolismus wider. *Hsp27* spiegelt als Hitzeschockprotein eine allgemeine Stressantwort wider. Gemessen wurde die Expression der Gene in den Kiemen, dem Gehirn, dem Herzen und der Leber von *Danio rerio*. ***P < 0.001; **P < 0.01.

Extrembedingungen, wie eine Hypoxie, können zur Deformierung von Proteinen führen. Hitzeschockproteine, wie Hsp27, sind in der Lage, die Sekundärstruktur dieser denaturierten Proteine durch erneute Faltung wiederherzustellen (Chaperon-Aktivität) (Garrido et al. 2012). Eine Hochregulation der Genexpression von Hsp27 spiegelt somit eine allgemeine Stressantwort wider. Nach einer 48-stündigen Hypoxie von 2 kPa O₂ (entspricht ungefähr 10 % des normalen Sauerstoffgehaltes) wird Hsp27 in den Kiemen und der Leber signifikant hochreguliert (Abb. 26). Im Gehirn wird die Genexpression von Hsp27 nur leicht hochreguliert, wohingegen sie im Herzen abnimmt. Unter Sauerstoffmangelbedingungen wird der Energiemetabolismus von aerober zu anaerober Glykolyse umgestellt. Da die Gesamtenergiemenge der anaeroben Glykolyse relativ gering ist, werden mehr Glykolyse-Moleküle benötigt, um die Energiegewinnung aufrecht zu erhalten. Eno1a ist ein Glykolyse-Enzym und katalysiert den Umsatz von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat. Als Glykolyse-Enzym lässt die Hochregulation der Genexpression von Eno1a Rückschlüsse auf die Umstellung des Energiestoffwechsels zu. Ähnlich wie Hsp27 wird die Genexpression von Eno1a signifikant in den Kiemen und der Leber hochreguliert und zeigt dadurch eine spezifische Antwort auf die Hypoxie auf. Im Gehirn und im Herzen gibt es keinen Unterschied der Genexpression von Eno1a unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen (Abb. 26).

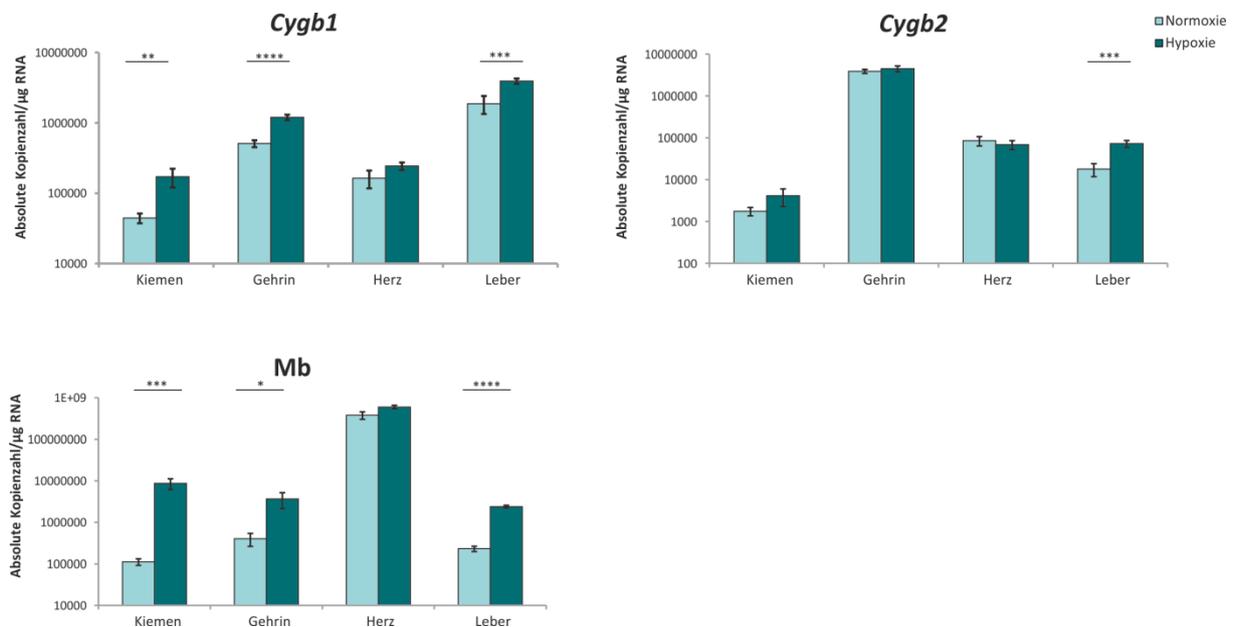


Abbildung 27 Genexpression von *Cygb1*, *Cygb2* und *Mb* bei Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen

Dargestellt sind die absoluten Kopienzahlen von *Cygb1*, *Cygb2* und *Mb* unter Normoxie (~ 18 kPa) und nach 48 Stunden Hypoxie (2 kPa). Gemessen wurde die Expression der Gene in den Kiemen, dem Gehirn, dem Herzen und der Leber von *Danio rerio*. **** P < 0.0001; ***P < 0.001; **P < 0.01; * P < 0.05.

Die Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* wird nach einer 48-stündigen Hypoxie unterschiedlich reguliert (Abb. 27). *Cygb2* wird ausschließlich in der Leber signifikant hochreguliert und bleibt im Gehirn gleich. In den Kiemen wird die Genexpression von *Cygb2* leicht hochreguliert, wohingegen sie im Herzen abnimmt. *Cygb1* wird in den Kiemen, der Leber und auch im Gehirn signifikant hochreguliert und zeigt im Herzen einen leichten Anstieg. Mb zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie *Cygb1* und wird ebenfalls in den Kiemen, der Leber und dem Gehirn signifikant hochreguliert (Abb. 27).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse auf, dass in den Kiemen und in der Leber eine physiologische Anpassung in Form einer Genregulation als Antwort auf die Hypoxie stattfindet (vgl. Genregulation von *Eno1a* und *Hsp27*, Abb. 26). Alle untersuchten Globine zeigen eine signifikante Hochregulation der Genexpression in der Leber auf. Darüber hinaus werden *Cygb1* und Mb noch in den Kiemen und interessanterweise im Gehirn hochreguliert. Im Gehirn ist die Regulation von *Cygb1* hochsignifikant. Diese verstärkte Expression von *Cygb1* könnte das Gehirn soweit schützen, dass in diesem Gewebe keine oder eine andere Hypoxie-Antwort messbar ist (vgl. Genregulation von *Eno1a* und *Hsp27*, Abb. 26). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Cygb1*, ähnlich wie Mb in Muskelzellen, als Sauerstoff-Speicher oder -Transportprotein fungiert.

3.3.2 Genexpression von *Cygb1* und *Cygb2* unter ROS-Stress-Bedingungen

Für den ROS-Versuch wurden sechs männliche Zebrafische für 24 Stunden in einem 6-Liter-Aquarium gehalten, in dem 1 µg Endosulfan pro Liter gelöst vorlag. Endosulfan führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) (Shao et al. 2012). Die Kontrollgruppe, die ebenfalls aus sechs männlichen Zebrafischen bestand, wurde im normalen Leitungswasser gehalten. Der Versuch wurde bei 22,5°C durchgeführt und die Fische wurden währenddessen nicht gefüttert. Die Auswertung der Genexpression wurde mittels qRT-PCR vorgenommen. Als Stress-Markergene wurden die Superoxiddismutase (SODII), Katalase und das Hitzeschockprotein 27 (*Hsp27*) verwendet.

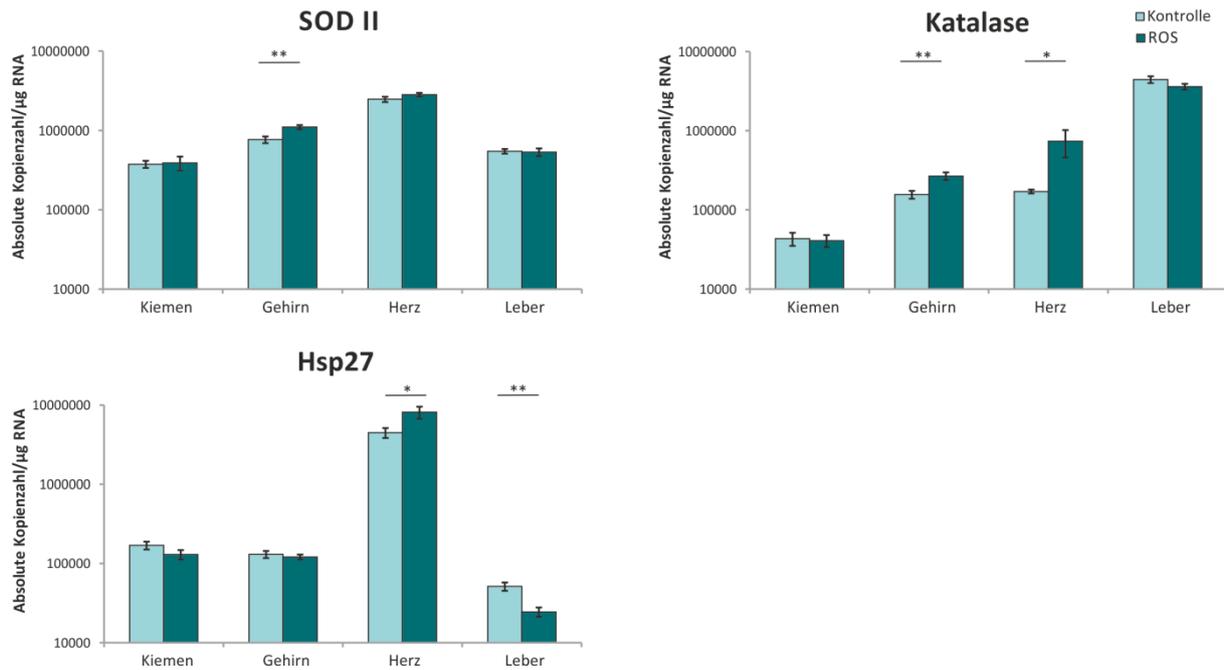


Abbildung 28 Genexpression von SODII, Katalase und Hsp27 bei Kontroll- und ROS-Bedingungen

Dargestellt sind die absoluten Kopienzahlen von Superoxiddismutase (SODII), Katalase und dem Hitzeschockprotein 27 (Hsp27) bei Kontroll- und ROS-Bedingungen [1 µg Endosulfan/l]. SODII sowie Katalase sind antioxidative Enzyme und Markergene für die Entstehung von ROS. Hsp27 spiegelt als Hitzeschockprotein eine allgemeine Stressantwort wider. Gemessen wurde die Expression der Gene in den Kiemen, dem Gehirn, dem Herzen und der Leber von *Danio rerio*. **P < 0.01; * P < 0.05.

Wie im Hypoxie-Versuch wurde das Hitzeschockprotein 27 (Hsp27) als allgemeiner Stressmarker verwendet. Im Herzen und in der Leber wird die Genexpression von Hsp27 signifikant reguliert, wobei die Genexpression im Herzen zunimmt und in der Leber abnimmt. In den Kiemen und dem Gehirn ist die Genexpression von Hsp27 unter Kontroll- und ROS-Bedingungen nahezu unverändert (Abb. 28). SODII und Katalase sind antioxidative Enzyme und sind an der Detoxifizierung von ROS beteiligt. SODII setzt Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) um und die Katalase katalysiert die Reaktion von H₂O₂ zu H₂O und O₂. Beide Enzyme fungieren daher als Markergene für ROS-Stress. Im Gehirn wird die Genexpression von SODII und der Katalase signifikant hochreguliert. Die Katalase wird darüber hinaus noch im Herzen signifikant hochreguliert. In den anderen Geweben bleibt die Genexpression der Markergene unter Kontroll- und ROS-Bedingungen nahezu unverändert (Abb. 28).

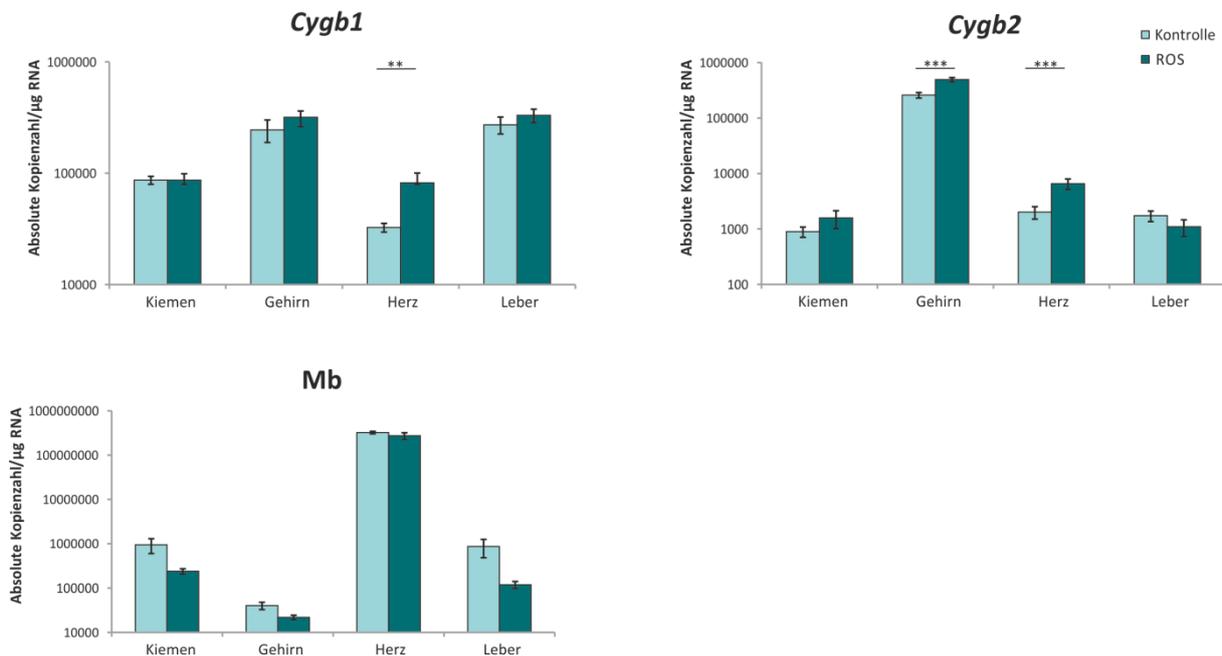


Abbildung 29 Genexpression von *Cygb1*, *Cygb2* und *Mb* bei Kontroll- und ROS-Bedingungen

Dargestellt sind die absoluten Kopienzahlen von *Cygb1*, *Cygb2* und *Mb* bei Kontroll- und ROS-Bedingungen [1 µg Endosulfan/l]. Gemessen wurde die Expression der Gene in den Kiemen, dem Gehirn, dem Herzen und der Leber von *Danio rerio*. ***P < 0.001; **P < 0.01.

Sowohl die Genexpression von *Cygb1* als auch die von *Cygb2* werden unter ROS-Bedingungen im Herzen signifikant hochreguliert. Zusätzlich wird *Cygb2* im Gehirn signifikant hochreguliert und in den Kiemen ist ein leichter Anstieg messbar. In der Leber hingegen wird die Genexpression von *Cygb2* leicht runterreguliert. *Cygb1* zeigt im Gehirn und in der Leber eine leicht Zunahme der Genexpression, wohingegen sie in den Kiemen unverändert bleibt. Die Genexpression von *Mb* wird in allen untersuchten Geweben leicht runterreguliert (Abb. 29).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Herzen und im Gehirn eine Anpassung, in Form einer Hochregulation der Genexpression, als Antwort auf die Entstehung von ROS messbar ist (vgl. Genregulation der Markergene, Abb. 28). Sowohl *Cygb1* als auch *Cygb2* werden im Herzen signifikant hochreguliert. Darüber hinaus wird die Genexpression von *Cygb2* im Gehirn hochreguliert, was auf eine Involvierung innerhalb der Detoxifizierung von ROS hindeuten könnte.

3.4 Generierung und Untersuchung einer *Cygb1*-Knockoutmutante

Die Funktionsuntersuchungen, mittels verschiedener Stressversuche (3.3), geben erste Hinweise und Einblicke auf die Funktion von *Cygb1* und *Cygb2*. Um die Funktionen genauer zu untersuchen und zu verifizieren, ist die Untersuchung von *Cygb1*- und *Cygb2*-Knockoutmutanten unabdingbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine *Cygb1*-Knockoutmutante mittels CRISPR/Cas9 generiert und untersucht. Eine *Cygb2*-Knockoutmutante wird in einer nachfolgenden Dissertation generiert und ist deswegen hier nicht weiter aufgeführt.

3.4.1 Generierung der *Cygb1*-Knockoutmutante mittels CRISPR/Cas9

Um eine *Cygb1*-Knockoutmutante zu erstellen, wurden zunächst spezifische gRNA-Moleküle designt (Abb. 30, B) und *in vitro* transkribiert (Abb. 30, A). Die CRISPR/Cas9-Komponenten wurden in unterschiedlichen Zusammensetzungen mit Hilfe des Nanoject III (Drummond Scientific) in einzellige Zebrafischeier injiziert. Hierbei lag die Konzentration der gRNAs zwischen 100 pg und 300 pg und die Konzentration der Cas9-Endonuklease zwischen 500 pg und 850 pg.

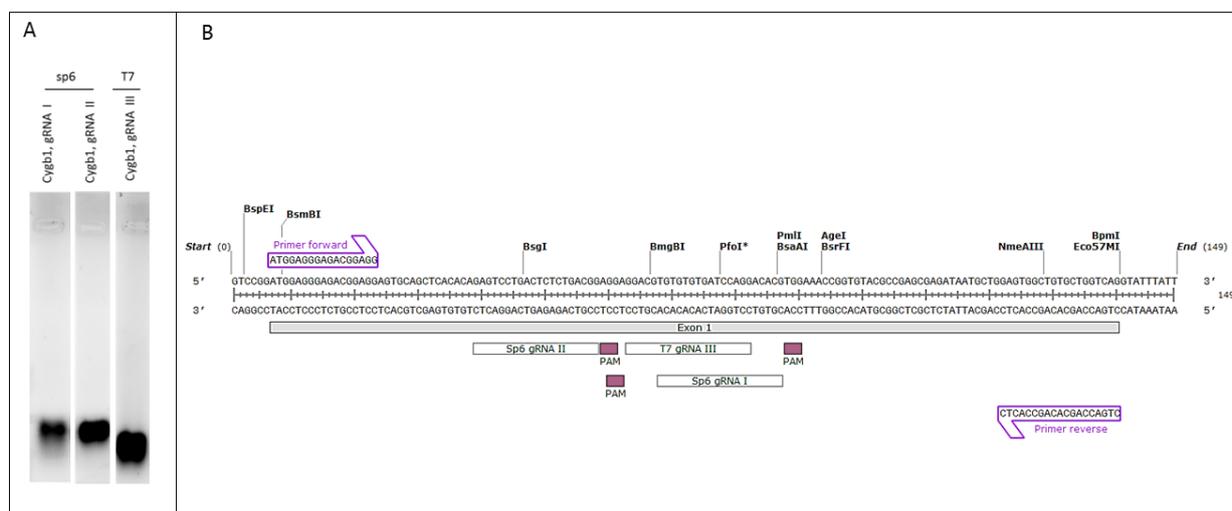


Abbildung 30 (A) *in vitro* transkribierte *Cygb1* gRNA's und (B) ihre Lokalisation in Exon 1

(A) Dargestellt sind die *in vitro* transkribierten *Cygb1* gRNA's. Es wurden von jeder gRNA 100 ng aufgetragen. (B) Alle drei gRNA-Sequenzen sind im ersten Exon von *Cygb1* lokalisiert. gRNA I und gRNA II wurden mit dem „MEGashortscript sp6 kit Ambion/Invitrogen“ (Thermo Fisher Scientific) und gRNA III mit dem „MEGashortscript T7 kit Ambion/Invitrogen“ (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben transkribiert.

Nach der Injektion wurden die Zebrafischeier in 25-Liter-Aquarien, mit einer durchschnittlichen Temperatur von 27°C, überführt. Nach drei Monaten wurden die Fische mittels *fin clipping* und nativer PAGE genotypisiert (2.6.3). Es wurden 23 putative *Cygb1*-Knockoutmutanten genotypisiert. Hierfür wurden die Zielsequenzen der putativen Knockoutmutanten amplifiziert und nach Beendigung der PCR bei 95°C denaturiert. Sind in dem PCR-Produkt ausschließlich WT-Sequenzen vorhanden, lagern sich die Produkte zu homoduplexen Fragmenten zusammen. Liegt ein Gemisch auf Wildtypsequenzen und Knockoutsequenzen vor, können die Sequenzen nicht vollständig hybridisieren und es kommt zur Ausbildung von heteroduplexen Fragmenten. Diese heteroduplexen Fragmente bilden Sekundärstrukturen aus, wodurch sie langsamer die native PAGE durchlaufen und sich deutlich von den homoduplexen Wildtypsequenzen abheben. Von diesen 23 putativen Knockoutmutanten zeigten die PCR-Produkte von drei Fischen heteroduplexe Fragmente (Abb. 31, Fisch 5, Fisch 8 und Fisch 17). Die Ausbildung von heteroduplexen Fragmenten war bei Fisch 17 am deutlichsten zu beobachten, weswegen dieser Fisch zur Etablierung einer *Cygb1*-Knockoutlinie genutzt wurde (*founder fish*).

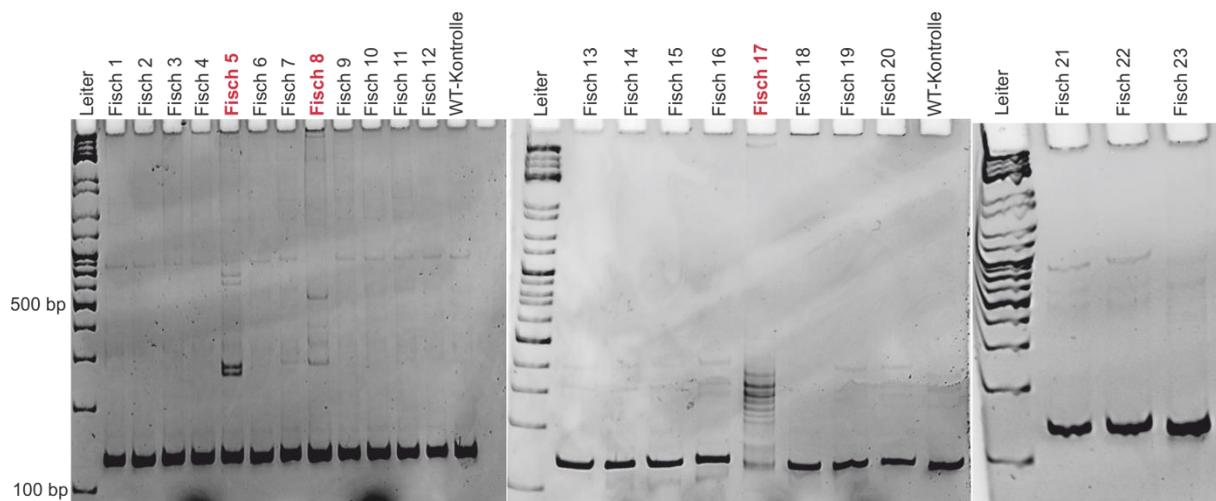


Abbildung 31 Genotypisierung putativer *Cygb1*-Knockoutmutanten

Dargestellt sind die PCR-Produkte von 23 putativen *Cygb1*-Knockoutmutanten sowie Wildtyp-Kontrollen (WT-Kontrolle). Die PCR-Produkte wurden, nach der Amplifizierung, bei 95°C denaturiert und konnten sich anschließend bei Raumtemperatur erneut zusammenlagern. Liegen in dem PCR-Produkt ausschließlich Wildtypsequenzen vor, bilden sich homoduplexe Fragmente aus, die auf der nativen PAGE als eine Bande sichtbar sind. Besteht das PCR-Produkt aus einem Gemisch an Wildtypsequenzen und Knockoutsequenzen, können sich die Produkte nicht vollständig zusammenlagern, wodurch unterschiedliche heteroduplexe Fragmente entstehen. Diese heteroduplexen Fragmente laufen langsamer durch die native PAGE, da sie an den nicht homologen Bereichen Sekundärstrukturen ausbilden (Fisch 5, Fisch 8 und Fisch 17).

Fisch 17 wurde mit einem Wildtyp-Zebrafisch verpaart und die Nachkommen wurden nach drei Monaten genotypisiert (eine beispielhafte Auswahl ist in Abb. 32 dargestellt). Die F1-Nachkommen zeichnen sich durch unterschiedliche Genotypen aus. Die PCR-Produkte einiger F1-Nachkommen bildeten homoduplexe Fragmente aus und waren demzufolge Wildtypen. Die PCR-Produkte der anderen Nachkommen zeigten unterschiedliche heteroduplexe Fragmente. Hierbei handelt es sich um verschiedene Knockout-Genotypen. Die unterschiedlichen Genotypen der F1-Nachkommen sind dadurch entstanden, dass im *founder* Fisch unterschiedliche *Cygb1*-Knockoutsequenzen in den Keimzellen vorlagen (Mosaik-Knockoutmutante). Diese unterschiedlichen Genotypen wiederholen sich innerhalb der F1-Generation, wodurch die Nachkommen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden konnten (Abb. 33).

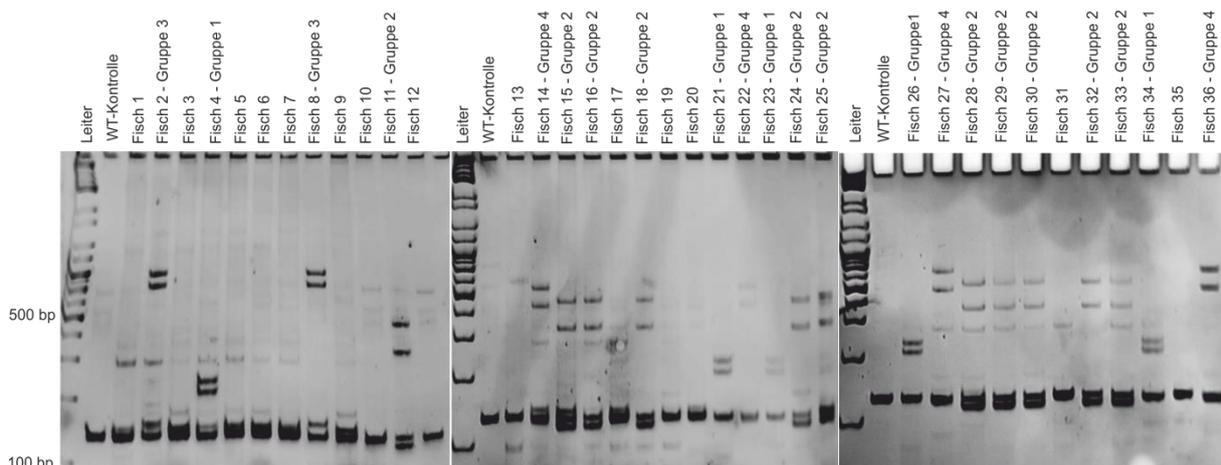


Abbildung 32 Genotypisierung der F1-Generation vom *founder* Fisch 17

Dargestellt sind die PCR-Produkte einiger Nachkommen von *founder* Fisch 17. Die PCR-Produkte wurden, nach der Amplifizierung, bei 95°C denaturiert und konnten sich anschließend bei Raumtemperatur erneut zusammenlagern. Liegen in dem PCR-Produkt ausschließlich Wildtypsequenzen vor, bilden sich homoduplexe Fragmente aus, die auf der nativen PAGE als eine Bande sichtbar sind. Besteht das PCR-Produkt aus einem Gemisch an Wildtypsequenzen und Knockoutsequenzen, können sich die Produkte nicht vollständig zusammenlagern, wodurch unterschiedliche heteroduplexe Fragmente entstehen. Diese heteroduplexen Fragmente laufen langsamer durch die native PAGE, da sie an den nicht homologen Bereichen Sekundärstrukturen ausbilden. Zu erkennen ist, dass sich die Bandenmuster der heteroduplexen Fragmente wiederholen. Die Fische wurden ihrem Bandenmuster entsprechend in Gruppen eingeteilt (Gruppe 1 - Gruppe 4, siehe Abb. 33). Als Positiv-Kontrolle wurden Wildtyp-PCR-Produkte mitgeführt (WT-Kontrolle).

Eine Auswahl der Gruppen (Gruppe 1 - Gruppe 4) ist in Abbildung 33 dargestellt. Das Muster der heteroduplexen Fragmente ist innerhalb der Gruppen gleich. Zur Verifizierung wurden jeweils

Sequenzen mehrerer Fische aus einer Gruppe sequenziert (Abb. 34) und eine weitere Kontrolle wurde mittels nativer PAGE durchgeführt (Abb. 35). Hierfür wurden die PCR-Produkte von jeweils zwei Fischen einer Gruppe vereint und bei 95°C denaturiert. Das Gemisch aus zwei PCR-Produkten einer Gruppe müsste das gleiche Bandenmuster wie ein einzelner Fisch aus der Gruppe zeigen. Als Negativ-Kontrolle wurden die PCR-Produkte aller Gruppen vereint. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Gemisch aus zwei PCR-Produkten, von Fischen einer Gruppe, dasselbe Bandenmuster wie ein einzelner Fisch aus dieser Gruppe aufzeigt. Das bedeutet, dass die Fische innerhalb der Gruppen tatsächlich dieselben Knockoutsequenzen aufweisen.

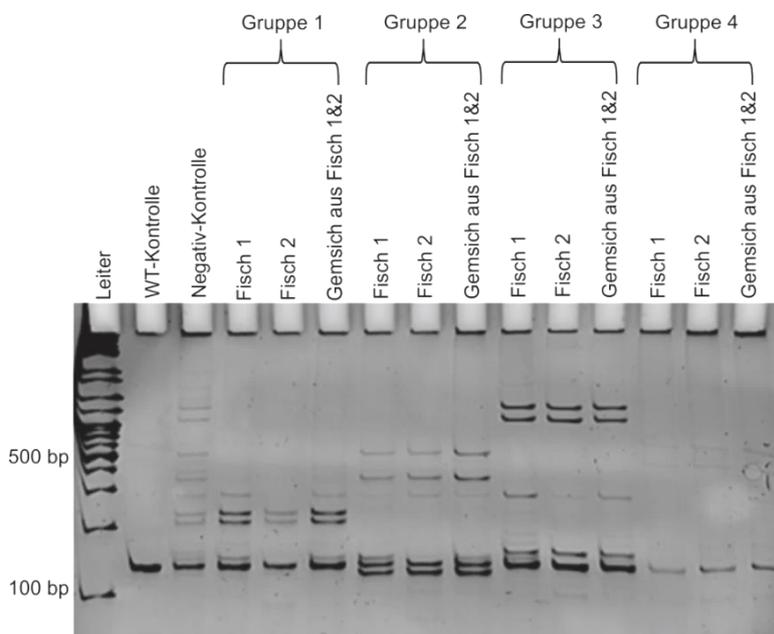


Abbildung 33 Kontrolle der Gruppeneinteilung der F1-Nachkommen vom *founder* Fisch17

Dargestellt sind die PCR-Produkte von jeweils zwei Fischen aus einer Gruppe und einem Gemisch aus den PCR-Produkten dieser beiden Fische. Die PCR-Produkte wurden, nach der Amplifizierung und nach dem Vereinen zweier PCR-Produkte aus einer Gruppe, bei 95°C denaturiert und konnten sich anschließend bei Raumtemperatur erneut zusammenlagern. Das Gemisch aus zwei PCR-Produkten einer Gruppe zeigt das gleiche Bandenmuster wie ein einzelner Fisch aus derselben Gruppe. Als Negativ-Kontrolle wurden die PCR-Produkte aller Gruppen vereint. Als Positiv-Kontrolle fungiert eine Wildtypsequenz (WT-Kontrolle).

Um die Gruppeneinteilung auf Sequenzebene zu bestätigen, wurden mindestens zwei Fische aus jeder Gruppe sequenziert (Abb. 34). Die Sequenzierung bestätigte erneut, dass die Fische innerhalb der Gruppen die gleichen Sequenzen aufzeigten. Fische der Gruppe 1 weisen eine Deletion von drei Nukleotiden *upstream* zur PAM-Sequenz, der sp6 gRNA II, auf.

Gruppe 1	
WT	5' ATGGAGGGAGACGGAGGAGTGCAGCTCACACAGAGTCCTGACTCTCTGACGGAGGAGGACGTGTGTGTATCCAGGA...3'
KO	5' ATGGAGGGAGACGGAGGAGTGCAGCTCACACAGAGTCCTGACTCTCT --- GGAGGAGGACGTGTGTGTATCCAGGA...3'
WT	MEGDGGVQLTQSPDSLTEEDVCVIQDTWKPVYAEERDNAGVAVLV
KO	MEGDGGVQLTQSPDSL - EEDVCVIQDTWKPVYAEERDNAGVAVLV
Gruppe 2	
WT	5' ATGGAGGGAGACGGAGGAGTGCAGCTCACACAGAGTCCTGACTCTCTGACGGAGGAGGACGTGTGTG --TGATCCAGGACA...3'
KO	5' ATGGAGGGAGACGGAGGAGTGCAGCTCACACAGAGTCCTGACTC -----GTGTGTGTGACGATCCAGGACA...3'
WT	MEGDGGVQLTQSPDSLTEEDVCVIQDTWKPVYAEERDNAGVAVLV
KO	MEGDGGVQLTQSPDSCV Stop
Gruppe 3	
WT	5' ATGGAGGGAGACGGAGGAGTGCAGCTCACACAGAGTCCTGACTCTCTGACGGAGGAGGACGTGTGTGTATCCAGGACACGTGAAACCGGTGTACGCCGAGCGAGATAATGCTGG...3'
KO	5' ATGGAGGGAGACGGAGGG-----CACACAACATTAA-----AGGACTCTG-----GG...3'
WT	MEGDGGVQLTQSPDSLTEEDVCVIQDTWKPVYAEERDNAGVAVLV
KO	MEGDGGHNI Stop
Gruppe 4 (nicht einkloniert)	
WT	5' ATGGAGGGAGACGGAGGAGTGCAGCTCACACAGAGTCCTGACTCTCTGACGGAGGAGGACGTG--TGTGTG-ATCCAGGA...3'
KO	5' ATGGAGGGAGACGGAGGAGTGCAGCTCACACAGAGTCCTGACTCTCTCTGTC-AGGAGGACGTGATGTGTGTATCCAG-A...3'
WT	MEGDGGVQLTQSPDSLTEEDVCVIQDTWKPVYAEERDNAGVAVLV
KO	MEGDGGVQLTQSPDSLCEDEVMC...
<p>Sp6 gRNA II (GAGTCCTGACTCTCTGACGGAGG)</p> <p>T7 gRNA III (GGAAGGACGTGTGTGTATCCAGG)</p> <p>PAM</p> <p>Indel-Mutation</p>	

Abbildung 34 Sequenzen der Gruppen der F1-Nachkommen vom *founder* Fisch F17

Dargestellt sind die Sequenzen der einzelnen Gruppen der F1-Nachkommen vom *founder* Fisch F17. Es wurden mindestens die Sequenzen von zwei Fischen aus jeder Gruppe sequenziert. Die Regionen der gRNA-Sequenzen (Sp6 gRNA II, T7 gRNA III), die vermutlich gebunden haben, sind in der Wildtypsequenz (WT) unterstrichen. Die PAM-Sequenz, die die gRNA Sequenz flankiert, ist in der Wildtypsequenz blau unterlegt. Die entstandenen Insertionen und Deletionen (Indel-Mutationen) sind in der Knockoutsequenz (KO) rot unterlegt. Die Knockoutsequenzen sind in allen Gruppen, auf Nukleotid- und Aminosäure-Ebene, im Vergleich zur Wildtypsequenz dargestellt.

Auf Aminosäureebene führte die Deletion der drei Nukleotide zur Deletion einer Aminosäure (T, Threonin). Fische der Gruppe 2 weisen eine Deletion von 16 Nukleotiden auf und eine Insertion von zwei Nukleotiden. Die Indel-Mutation der Gruppe 2 ist auf die Hybridisierung der sp6 gRNA II und T7 gRNA III zurückzuführen. Auf Aminosäureebene führte die Deletion der 16 Nukleotide zum Austausch der Aminosäuren Leucin und Threonin zu Cystein und Valin. Darüber hinaus führte die Deletion zum Einbau eines Stopp-Codons im ersten Exon der *Cygb1*-Sequenz. Die Sequenz der Gruppe 3 zeigt ebenfalls auf, dass es zu einer Hybridisierung der sp6 gRNA II und T7 gRNA III an die Zielsequenz kam. Das Binden der gRNAs und der damit einhergehende Doppelstrangbruch durch die Cas9-Endonuklease führten in Gruppe 3 zu Indel-Mutationen. Auf Aminosäureebene kam es dadurch zum Austausch von Aminosäuren und zum

Einbau eines Stopp-Codons im ersten Exon. In Gruppe 4 kam es ebenfalls zu Indel-Mutationen, die zum Austausch von mehreren Aminosäuren führten. Für die Etablierung der *Cygb1*-Knockoutlinie wurde mit Gruppe 2 weitergearbeitet, da hier ein Stopp-Codon im ersten Exon eingebaut wurde und es in dieser Gruppe ausreichend Fische für eine große Nachzucht gab. Die Verpaarung wurde wie unter Punkt 2.6.4 beschrieben durchgeführt.

Nachdem die Fische der Gruppe 2 miteinander verpaart worden waren, wurden die daraus resultierenden F2-Nachkommen genotypisiert. Die Genotypisierung wurde erneut mittels nativer PAGE durchgeführt. Die PCR-Produkte der F2-Nachkommen wurden bei 95°C denaturiert, bevor sie sich bei Raumtemperatur zusammenlagern konnten. Die PCR-Produkte wurden auf eine native PAGE aufgetragen und die Ergebnisse sind in Abbildung 38 beispielhaft zusammengestellt. Die heterozygoten Nachkommen bilden heteroduplexe Fragmente aus, die sich deutlich von den anderen Sequenzen abheben. Die Wildtypen und die homozygoten Knockoutmutanten können im ersten Schritt nicht auseinandergehalten werden, da ihre Sequenzen nach dem Denaturieren vollständig hybridisieren und so homoduplexe Fragmente ausbilden.

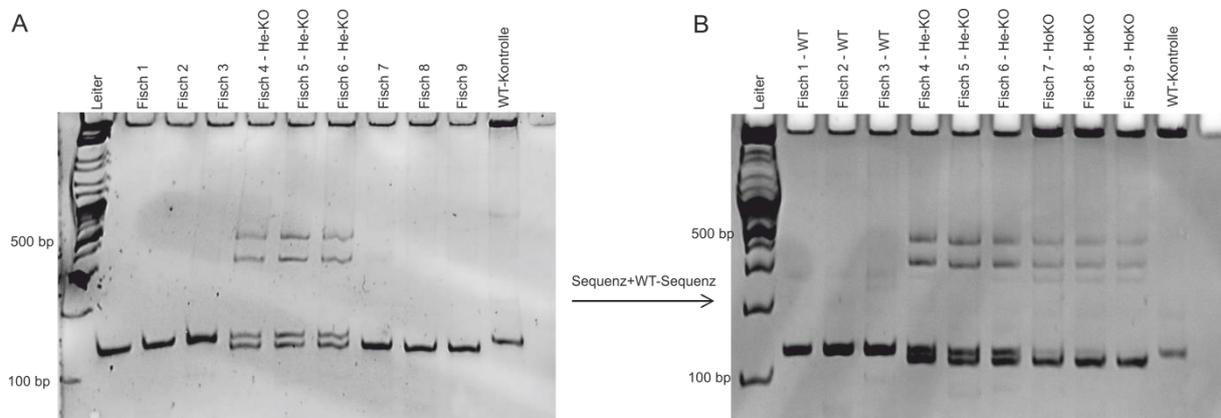


Abbildung 35 Genotypisierung der F2-Nachkommen von Fisch 17 aus Gruppe 2

Abgebildet ist eine beispielhafte Auswahl der Genotypisierung der F2-Nachkommen von Fisch 17 aus der Gruppe 2. Die F2-Nachkommen der Gruppe 2 bilden ein Gemisch aus Wildtypen (WT), heterozygoten (HeKO) und homozygoten Knockoutmutanten (HoKO). Zunächst wurden die PCR-Produkte der einzelnen Fische bei 95°C denaturiert und konnten sich danach bei Raumtemperatur wieder zusammenlagern (A). Um zwischen Wildtypen und homozygoten Knockoutmutanten zu differenzieren, wurden im nächsten Schritt die PCR-Produkte der Fische mit einer Wildtyp-Kontrollsequenz vereint, bevor sie erneut denaturiert wurde (B).

Um die Wildtypen und die homozygoten Knockoutmutanten zu unterscheiden, wurden die PCR-Produkte aller F2-Nachkommen mit einer Wildtyp-Kontrollsequenz vereint, bevor sie

erneut bei 95°C denaturiert wurden. Die Wildtypen bilden auch mit der Wildtyp-Kontrollsequenz homoduplexe Fragmente aus. Die heterozygoten Fische zeigen wie zuvor heteroduplexe Fragmente. Die Sequenzen der homozygoten Knockoutmutanten können mit der Wildtyp-Kontrollsequenz nicht vollständig hybridisieren und verhalten sich nun wie die heterozygoten Knockoutsequenzen. Die homozygoten Knockoutsequenzen bilden mit der Wildtyp-Kontrollsequenz also die gleichen heteroduplexen Fragmente wie die heterozygoten Fische aus (Abb. 35, B). Für die Etablierung einer stabilen *Cygb1*-Knockoutlinie wurden die homozygoten Knockoutmutanten erneut miteinander verpaart.

Um zu überprüfen, ob der *Cygb1*-Knockout der Gruppe 2 zu einer verminderten Genexpression von *Cygb1* führt, wurde diese mittels qRT-PCR, im Vergleich zum *Cygb1*-Wildtypen, ermittelt (Abb. 36).

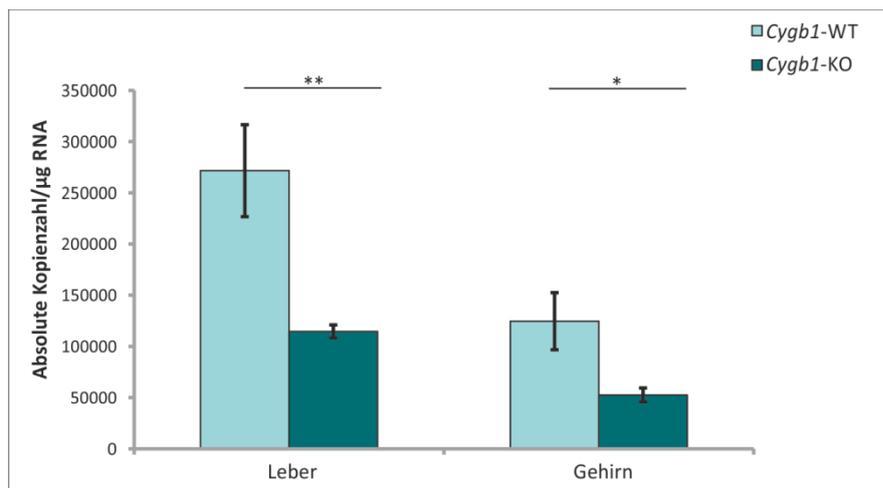


Abbildung 36 Genexpression von *Cygb1* im Wildtypen und im *Cygb1*-Knockout

Dargestellt ist die Genexpression von *Cygb1* im Wildtypen (*Cygb1*-WT) und im *Cygb1*-Knockout (*Cygb1*-KO). Die Genexpression von *Cygb1* ist im Knockout sowohl in der Leber als auch im Gehirn signifikant verringert. Die verwendeten qRT-PCR-Primer sind im ersten Exon lokalisiert.

Die Analyse der Genexpression zeigt deutlich auf, dass *Cygb1* in der Leber und im Gehirn in der *Cygb1*-Knockoutmutante signifikant geringer exprimiert wird als im Wildtypen. Eine restliche Expression ist vermutlich sichtbar, da die Primer im ersten Exon von *Cygb1* lokalisiert sind und der gezielte Abbau der defekten mRNA (z.B. durch ein Stopp-Codon im ersten Exon) mittels *nonsense-mediated mRNA decay* noch nicht vollständig vollzogen ist. Daher wurde als weitere Kontrolle eine *in situ*-Hybridisierung mit *Cygb1*-antisense-Sonden im 3' UTR-Bereich (Anhang

Abb. 1) durchgeführt. Der Abbau der fehlerhaften mRNA mittels *nonsense-mediated mRNA decay* sollte nach drei Exon-Exon Übergängen im 3' UTR-Bereich deutlich messbar sein. Die Ergebnisse der *whole mount in situ*-Hybridisierung sind in Abbildung 37 zusammengefasst. Deutlich zu erkennen ist ein Signal von *Cygb1* im *Cygb1*-Wildtypen (Abb. 37, B). In der *Cygb1*-Knockoutmutante hingegen ist kein Signal detektierbar (Abb. 37, C). Als Kontrolle wurde ein *Cygb1*-Wildtyp verwendet, bei dem, anstatt der spezifischen *Cygb1*-Sonde, eine Kontrollsonde aus dem „Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)“ verwendet wurde. Die Färbung mit der Kontrollsonde zeigt im *Cygb1*-Wildtypen ebenfalls kein Signal (Abb. 37, A). Die *whole mount in situ*-Hybridisierung zeigt deutlich, dass die defekte *Cygb1*-Knockout mRNA abgebaut wird.

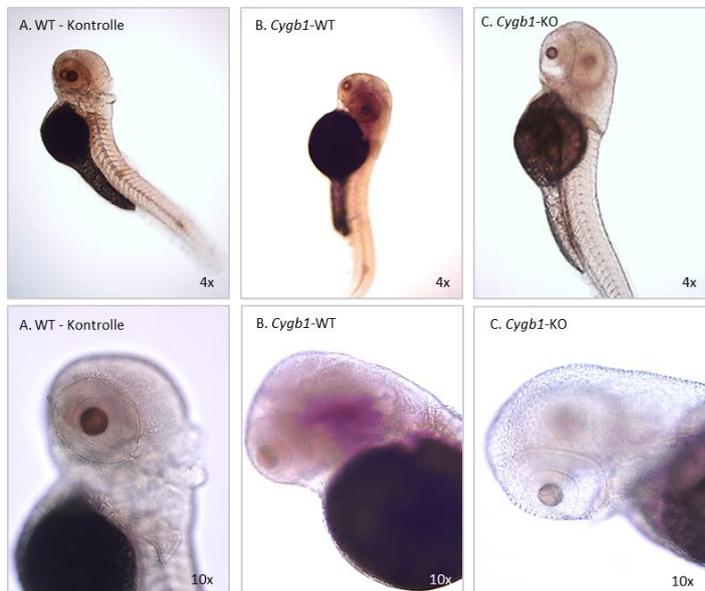


Abbildung 37 *Cygb1* whole mount in situ-Hybridisierung im Wildtypen und im *Cygb1*-Knockout

Dargestellt sind *in situ*-Hybridisierungen gegen *Cygb1* in 72 hpf alten *Danio rerio* Embryonen (hpf=*hours post fertilization*). Die *Cygb1* *in situ*-Hybridisierung wurde im *Cygb1*-Wildtypen (B) und im *Cygb1*-Knockout (C) durchgeführt. Als Kontrolle wurde ebenfalls ein *Cygb1*-Wildtyp verwendet, wobei eine Kontrollsonde aus dem „Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)“ anstelle der *Cygb1*-Sonde verwendet wurde (A). Ein deutliches Signal lässt sich im *Cygb1*-Wildtypen (*Cygb1*-WT, B) erkennen. Die Kontrolle und der *Cygb1*-Knockout (*Cygb1*-KO) zeigen kein Signal.

3.4.2 Phänotypische Untersuchungen der *Cygb1*-Knockoutmutante zeigen keine Abnormitäten auf

Eine zunehmende Genexpression von *Cygb1* ab 31 hpf konnte bereits in Zebrafischlarven beschrieben werden (Tiedke et al. 2011). Um zu überprüfen, ob *Cygb1* einen direkten Einfluss auf die Organogenese und die Entwicklung von Zebrafisch-Embryonen hat, wurde die Entwicklung

der *Cygb1*-Knockoutmutante im Vergleich zum *Cygb1*-Wildtypen dokumentiert (Abb. 38). Hierbei wurden sechs verschiedene Stadien während der Zebrafisch-Entwicklung untersucht.

Nach 2,75 hpf (zehnter Zellzyklus, 512-Zellstadium) beginnt die zygotische Genexpression. Die zunehmende Transkription geht mit einer verlangsamten Zellteilung und einer zunehmenden Zellmotilität einher (Kane und Kimmel 1993). Zwischen 2,25 hpf und 5,25 hpf liegt die Blastulaperiode vor. Innerhalb dieser Periode wird die Furchung abgeschlossen und das Blastoderm liegt am animalen Pol auf dem Dottersack auf. Die erste Dokumentation fand nach 3 hpf statt. Zu diesem Zeitpunkt besteht das Blastoderm aus ungefähr 1000 Zellen (1K cell). Die Entwicklung der *Cygb1*-Wildtypen und der *Cygb1*-Knockoutmutanten ist zu diesem Zeitpunkt gleichermaßen vorangeschritten. Durch Epibolie beginnen sich die Zellen (ab ungefähr 1000 Zellen) um den Dotter zu bewegen. Durch die Gastrulationsbewegungen beginnt die Ausdünnung der Zellen vom animalen Pol zum vegetativen Pol des Embryos, wobei nun die Kanten der Zellscheiben nach innen wandern. Dadurch entstehen ein äußerer und ein innerer Zellstreifen, wobei der äußere später zum Ektoderm (Haut, Nerven, Sinnesorgane) und der innere zum Mesoderm (Muskeln, Knochen, Herz, Blut, Lymphe, Niere, Geschlechtsorgane) und Entoderm (Speiseröhre, Magen, Darm, Leber, Lunge) wird. Die Gastrulationsbewegung führt dazu, dass die Blastodermzellen den Dotter schließlich fast vollständig bedecken (Solnica-Krezel und Driever 1994). Nach 9 hpf sind circa 90 % des Dotters mit Blastodermzellen bedeckt (90 % Epiboly). Zu diesem Zeitpunkt wurde die nächste Dokumentation vorgenommen, wobei auch hier der *Cygb1*-Wildtyp und die *Cygb1*-Knockoutmutante gleich entwickelt sind.

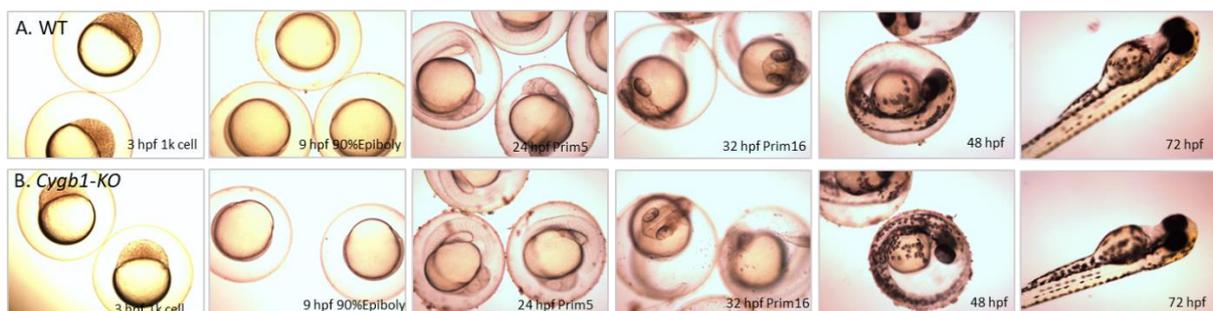


Abbildung 38 Phänotypische Untersuchung von *Cygb1*-Wildtypen und *Cygb1*-Knockoutmutanten

Dargestellt sind verschiedene Entwicklungsstadien von Zebrafischlarven im Wildtypen (A. WT) und in Knockoutmutanten (B. KO).

Nach der Segmentierungsperiode (10 hpf - 24 hpf), in der die Entwicklung der Somiten stattfindet, die Anlagen der Primärorgane sichtbar werden, die Schwanzknospe ausgeprägt wird und die Verlängerung des Embryos erfolgt, folgt die Pharyngulaperiode (24 hpf - 48 hpf), in der die Kiemenbögen entstehen. Der zweite und dritte Kiemenbogen entwickeln den Kiefer und das Zungenbein, aus den dahinterliegenden Kiemenbögen entstehen die Kiemen. Während der Pharyngulaperiode wurden Aufnahmen nach 24 hpf und 32 hpf gemacht. Auch hier sind die *Cygb1*-Wildtypen und die *Cygb1*-Knockoutmutanten gleichermaßen entwickelt. Auf die Pharyngulaperiode folgt die Schlüpfperiode und ein frühes Larvalstadium (48 hpf - 72 hpf). Während dieser Phase ist die Ausbildung der Organe, mit Ausnahme des Darms, abgeschlossen. Die tiefliegende Position der Organe erschwert allerdings die Visualisierung. Nach 3 dpf (72 hpf) schlüpfen die Embryonen aus dem Chorion. Es wurden nach 48 hpf und 72 hpf Aufnahmen gemacht, die zeigen, dass die *Cygb1*-Wildtypen und die *Cygb1*-Knockoutmutanten gleichermaßen entwickelt sind. Die *Cygb1*-Knockoutmutanten zeigen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte phänotypische Auffälligkeiten oder Fehlbildungen auf.

3.4.3 Analyse der Gehirn- und Leber-Transkriptome der *Cygb1*-Knockoutmutante

Für eine genaue Funktionsuntersuchung von *Cygb1* wurden die Transkriptome der *Cygb1*-Knockoutmutante im Vergleich zu *Cygb1*-Wildtypen analysiert. Über die Analyse der regulierten Gene im *Cygb1*-Knockout können Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von *Cygb1* gezogen werden. Bei runterregulierten Genen könnte es sich um mögliche Interaktionspartner von *Cygb1* handeln. Hochregulierte Gene könnten die Funktionen von *Cygb1* partiell übernehmen. Für diese Analyse wurden die Transkriptome der Leber und des Gehirns von *Cygb1*-Knockoutmutanten und *Cygb1*-Wildtypen untersucht und miteinander verglichen. Die Leber bietet sich, als einer der Hauptexpressionsorte von *Cygb1* und als ein metabolisch sehr aktives Organ, für die Funktionsuntersuchung von *Cygb1* an. Das Gehirn bildet die Steuerzentrale des Körpers und ist als Teil des zentralen Nervensystems ebenfalls von großem Interesse. Darüber hinaus ist das Gehirn der Hauptexpressionsort von *Cygb2*, wodurch sich möglicherweise erkennen lässt, ob die duplizierten *Cygb*-Gene die Funktion der anderen Gen-Kopie übernehmen können.

In den durchgeführten Hypoxie-Versuchen (3.3.1) wird *Cygb1* außerdem im Gehirn unter Sauerstoffmangel signifikant hochreguliert, wohingegen die Markergene nicht reguliert

werden. Dies könnte auf eine protektive Funktion von *Cygb1* im Gehirn hindeuten, die anhand der Transkriptomanalysen untersucht werden kann.

Neben der Transkriptomanalyse unter physiologisch normalen Bedingungen (Normoxie) wurden Transkriptome unter Hypoxie-Bedingungen angefertigt. Die vorab durchgeführten Hypoxie-Versuche (3.3.1) zeigen, dass die Genexpression von *Cygb1* unter Hypoxie in allen untersuchten Geweben hochreguliert wird. Um die Funktion von *Cygb1* während eines Sauerstoffmangels zu untersuchen, wurden die Transkriptome der *Cygb1*-Knockoutmutanten und der *Cygb1*-Wildtypen unter Hypoxie-Bedingungen analysiert.

Im Durchschnitt wurden mittels Illumina-Sequenzierung pro Transkriptom-Datensatz 41 Millionen *paired end reads* angefertigt. Von diesen *paired end reads* haben durchschnittlich 84,85 % gemappt, von denen etwa 90,86 % gegen Gene gemappt haben. Insgesamt wurden 24 Datensätze generiert (Anhang Tab. 4).

3.4.3.1 Hauptkomponentenanalyse der Transkriptome

Mittels einer Hauptkomponentenanalyse (*Principal component analysis-PCA*) wurden zunächst alle angefertigten Transkriptom-Datensätze, ihrer Expression entsprechend, auf Variabilitäten und Ähnlichkeiten hin überprüft. Anhand der Hauptkomponentenanalyse (Abb. 39) lässt sich erkennen, dass sich die Genexpression der Leber- und Gehirn-Proben deutlich voneinander unterscheiden. Die Gehirn-Proben gruppieren miteinander, was auf eine sehr ähnliche Expression innerhalb der Proben hindeutet. Die Leber-Proben zeigen ein diffuseres Muster, was auf mehr Variabilitäten innerhalb der Leber-Proben hindeutet. Sowohl der Genotyp (KO-blau, WT-grün) als auch die physiologischen Bedingungen (Hypoxie- Kreuz, Normoxie- Plus) führen nicht zur Bildung von weiteren Gruppierungen. Die Gesamtheit der KO- und Hypoxie-Transkriptome weichen demnach nicht stark von den biologischen Ausgangsbedingungen (WT und Normoxie) ab.

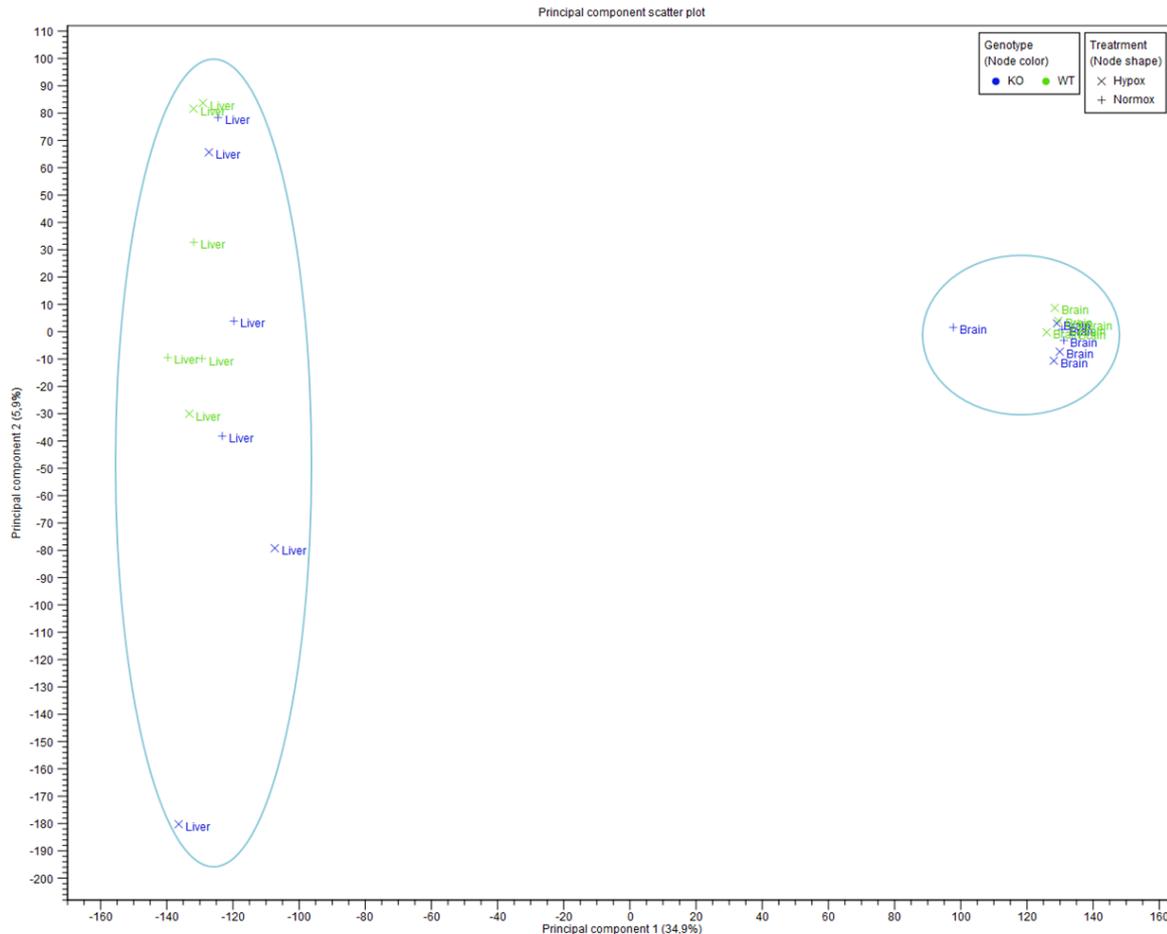


Abbildung 39 Hauptkomponentenanalyse der gesamten Transkriptom-Datensätze

Dargestellt ist eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*-PCA), die die eingespeisten Transkriptom-Datensätze, basierend auf ihrer Expression, auf Variabilitäten und Ähnlichkeiten hin überprüft und dementsprechend in einem zweidimensionalen Koordinatensystem *clustert*. Abgebildet sind die Transkriptome der Leber- und Gehirn-Proben. In Blau ist der KO-Genotyp und in Grün der WT-Genotyp dargestellt. Die Normoxie-Proben sind durch ein Plus und die Hypoxie-Proben durch ein Kreuz markiert.

3.4.3.2 Regulierte Gene innerhalb verschiedener Vergleichsgruppen

Im Rahmen der Transkriptomanalyse wurden sechs Vergleichsgruppen erstellt, wovon sich drei auf die Leber-Proben und drei auf die Gehirn-Proben beziehen (Tab. 15). In allen durchgeführten Auswertungen wurden Gene mit einbezogen, die mindestens einen *fold change* von 3 aufzeigten und durch ein FDR p-value von $\leq 0,05$ gestützt sind. Um zu untersuchen, ob der *Cygb1*-Knockout, unter physiologisch normalen Bedingungen, direkten Einfluss auf die Expression anderer Gene nimmt, wurden zunächst die Expressionsunterschiede zwischen den *Cygb1*-Wildtypen und *Cygb1*-Knockoutmutanten unter Normoxie-Bedingungen analysiert (siehe Vergleichsgruppen 1 und 4, Tab. 15, 3.4.3.3).

Tabelle 15 Übersicht der regulierten Gene innerhalb der verschiedenen Vergleichsgruppen der Transkriptomanalyse

Zu den regulierten Genen zählen Gene, die ein *fold change* von ≥ 3 haben und einen FDR p-value von $\leq 0,05$.

	Reguliert	Hochreguliert	Runterreguliert
1 Leber, Normoxie, KO vs. WT	146	60	86
2 Leber, KO, Hypoxie vs. Normoxie	130	113	17
3 Leber, WT, Hypoxie vs. Normoxie	61	29	32
4 Gehirn, Normoxie, KO vs. WT	134	76	58
5 Gehirn, KO, Hypoxie vs. Normoxie	52	11	41
6 Gehirn, WT, Hypoxie vs. Normoxie	78	56	22

In der Leber des *Cygb1*-Knockouts findet eine Regulation von 146 Genen statt, von denen 60 hochreguliert und 86 runterreguliert werden. Im Gehirn werden im *Cygb1*-Knockout mit 134 Genen etwas weniger Gene reguliert, wobei 76 hochreguliert und 58 runterreguliert werden. Die Genprodukte der hochregulierten Gene können möglicherweise die Funktion von *Cygb1* übernehmen, wohingegen die Genprodukte der runterregulierten Gene putative Interaktionspartner sind. Deutlich zu erkennen ist, dass in der Leber mehr Gene runterreguliert als hochreguliert und im Gehirn mehr hochreguliert als runterreguliert werden. Die Umstellung der Genexpression als Antwort auf den *Cygb1*-Knockout scheint demnach gewebespezifisch zu sein, wobei in der Leber möglicherweise mehr Interaktionspartner runterreguliert werden und im Gehirn eher Gene hochreguliert werden, dessen Genprodukte die Funktion von *Cygb1* übernehmen. Hervorzuheben ist hierbei die signifikante Hochregulation von Hämoglobin im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante unter Normoxie-Bedingungen (Tab. 17). Eine genaue Untersuchung der regulierten Gene unter Normoxie-Bedingungen im Gehirn und in der Leber ist unter Punkt 3.4.3.3 aufgeführt.

Die weiteren Vergleichsgruppen untersuchen die Genregulation als Anpassung an einen Sauerstoffmangel (siehe Vergleichsgruppen 2, 3, 5 und 6, Tab. 15, 3.4.3.4 – 3.4.3.4.2). Hierbei wurde die Genexpression innerhalb der *Cygb1*-Wildtypen und *Cygb1*-Knockoutmutanten unter Hypoxie-Bedingungen im Vergleich zu Normoxie-Bedingungen untersucht. Zu erkennen ist, dass in der Leber der *Cygb1*-Knockoutmutante mit 130 regulierten Genen die stärkste Regulation stattfindet. In der Leber des *Cygb1*-Wildtyps werden hingegen nur 61 Gene reguliert. Eine genauere Analyse der Hypoxie-Antwort in der Leber ist unter Punkt 3.4.3.4.2 aufgeführt. Im Gehirn zeigt sich ein gegenteiliges Bild. Hier werden im *Cygb1*-Knockout mit 52 Genen

weniger Gene als im *Cygb1*-Wildtyp reguliert (78). Die schwächere Genregulation im Gehirn des *Cygb1*-Knockouts deutet darauf hin, dass bereits unter Normoxie-Bedingungen eine Umstellung der Genexpression stattfindet, die unter Hypoxie-Bedingungen vor einem Sauerstoffmangel schützt. Eine genaue Analyse zur Umstellung der Genexpression unter Hypoxie-Bedingungen im Gehirn ist unter Punkt 3.4.3.4.1 aufgeführt.

3.4.3.3 Umstellung der Genexpression als Anpassung an den *Cygb1*-Knockout unter Normoxie-Bedingungen

Eine Umstellung der Genexpression als Anpassung an den *Cygb1*-Knockout scheint in der Leber und im Gehirn weitestgehend gewebespezifisch zu sein (Abb. 40, A). Jedoch werden acht gleiche Gene sowohl in der Leber als auch im Gehirn reguliert (Tab. 16). In beiden Geweben wird das Gen Apaf-1 hochreguliert, dessen Genprodukt eine Rolle in der Apoptose spielt (Inohara und Nunez 2000). In Kombination mit der Runterregulation von *mhc1zba* (Antigenpräsentation für zytotoxische T-Zellen sowie der Schutz von gesunden Zellen (Dirscherl und Yoder 2014)) könnte im *Cygb1*-Knockout verstärkt der programmierte Zelltod in einer Vielzahl von Zellen eingeleitet werden. Eine entgegengesetzte Regulation findet bei der Lanosterol-Synthase (*Lss*) statt, die an der Cholesterin-Biosynthese beteiligt ist (Zhao et al. 2015). Die Lanosterol-Synthase wird im Gehirn hochreguliert und in der Leber runterreguliert, was ebenfalls für eine gewebespezifische Antwort auf den *Cygb1*-Knockout spricht.

Tabelle 16 Übersicht der acht Gene, die unter Normoxie-Bedingungen in beiden Geweben reguliert werden

Zu den regulierten Genen zählen Gene, die ein *fold change* von ≥ 3 haben und einen FDR p-value von $\leq 0,05$.

Gene	Gewebe	Fold change	FDR p-value	Genprodukt-Beschreibung
Apip/Apaf-1	Gehirn	28,78	0,03	Spielt eine Rolle bei der Apoptose
	Leber	43,59	0,02	
LOC100003687	Gehirn	18,70	5,96E-3	unbekannte Funktion
	Leber	111,62	1,10E-3	
Lss	Gehirn	3,07	0,03	beteiligt an der Cholesterin-Biosynthese, vermutlich in Lipidtröpfchen lokalisiert
	Leber	-6,63	0,02	
ccdc40	Gehirn	-6,34	1,04E-5	<i>coiled-coil domain containing 40</i> , notwendig für die motile Zilienfunktion
	Leber	-9,94	1,11E-4	
mhc1zba	Gehirn	-9,10	6,29E-9	<i>major histocompatibility complex class</i> , Präsentation für zytotoxische T-Zellen, Schutz gesunder Zellen
	Leber	-6,79	0,01	
nos2a	Gehirn	-15,04	2,22E-4	<i>nitric oxide synthase 2a inducible</i> , Oxidoreduktase-Aktivität
	Leber	-10,85	0,05	
si:dkey-88n24.5	Gehirn	-173,70	1,51E-6	<i>C-type lectin</i> , Kohlenhydrat- und Calcium bindendes Protein, Zell-Zell-Adhäsion, Immunantwort und Apoptose
	Leber	-155,31	3,60E-5	
zgc:194659	Gehirn	-917,49	3,26E-10	ist wahrscheinlich eine regulatorische RNA, die die Mitglieder der GTPase IMAP-Familie reguliert (Blast Analyse)
	Leber	-315,17	1,66E-6	

Runterreguliert werden des Weiteren die Gene *ccdc40*, *nos2a*, *si:dkey-88n24.5* und *zgc:194659*. Das Genprodukt von *Ccdc40* ist ein *coiled-coil domain containing 40* Protein, welches essentiell für die Funktion von motilen Zilien ist (Song et al. 2016). Neben der Umstellung der Cholesterin-Biosynthese zeigt der Einfluss auf die Funktion von Zilien eine weitere Umstellung innerhalb der extrazellulären Matrixstrukturbestandteile als Resultat des *Cygb1*-Knockouts auf. Des Weiteren wird die *inducible nitric oxide synthase 2a* (*nos2a*) runterreguliert, die unter Verwendung von Sauerstoff aus L-Arginin Stickstoffmonoxid synthetisiert (Lepiller et al. 2009). Das Genprodukt von *Si:dkey-88n24.5* ist ein *C-type lectin* Protein und in der Lage Kohlenhydrate und Calcium zu binden. Es spielt eine Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion, in der Immunantwort und in der Apoptose³⁰. Die mRNA von *Si:dkey-88n24.5* wird in beiden Geweben des *Cygb1*-Knockouts signifikant runterreguliert. Für das Genprodukt von *zgc:194659* sind zum jetzigen Zeitpunkt keine genauen Funktionen beschrieben. Eine *blast* Analyse ergab, dass es sich vermutlich um eine regulatorische RNA handelt, die Mitglieder der GTPase IMAP-Familie reguliert.

Abgesehen von den acht gemeinsam regulierten Genen ist die Umstellung der Genexpression als Antwort auf den *Cygb1*-Knockout gewebespezifisch. Mit Hilfe von PANTHER³¹ wurden *statistical overrepresentation tests* durchgeführt, die innerhalb der hochregulierten und runterregulierten Gene nach signifikant überrepräsentierten Genen mit ähnlichen Funktionen suchen. In der Leber wurden sowohl bei den hochregulierten als auch bei den runterregulierten Genen überrepräsentierte Gene ermittelt, dessen Genprodukte ähnliche Funktionen aufweisen (Abb. 40, A, B). Hochreguliert werden Gene, dessen Genprodukte mit Na-K-2Cl-Cotransportern (NKCC) assoziiert sind, Steroidhydroxylase- und Oxidoreduktase-Aktivitäten aufzeigen und Häm oder Eisenion binden können. Innerhalb der runterregulierten Gene sind Gene überrepräsentiert, dessen Genprodukte an der Cholesterin-Biosynthese beteiligt sind. Die Expressionsanalyse im Gehirn zeigte keine signifikant überrepräsentierten Gene auf, dessen Genprodukte ähnliche Funktionen aufweisen. Zu den Top-hochregulierten Genen zählen jedoch Gene, die Proteine der Familien der Zinkfinger und Peptidasen kodieren (Abb. 40, A). Darüber hinaus werden Gene hochreguliert, dessen Genprodukte Cholesterin, Chitin oder Fettsäure bindende oder biosynthetische Eigenschaften aufzeigen. Gene, von denen die Genprodukte Calcium binden oder an der Angiogenese beteiligt sind, werden ebenfalls

³⁰ <https://www.uniprot.org/uniprot/E9QEL4> (24.04.2019)

³¹ <http://www.pantherdb.org/> (24.04.2019)

hochreguliert. Darüber hinaus findet im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutanten eine signifikante Hochregulation von Hämoglobin statt (Tab. 17).

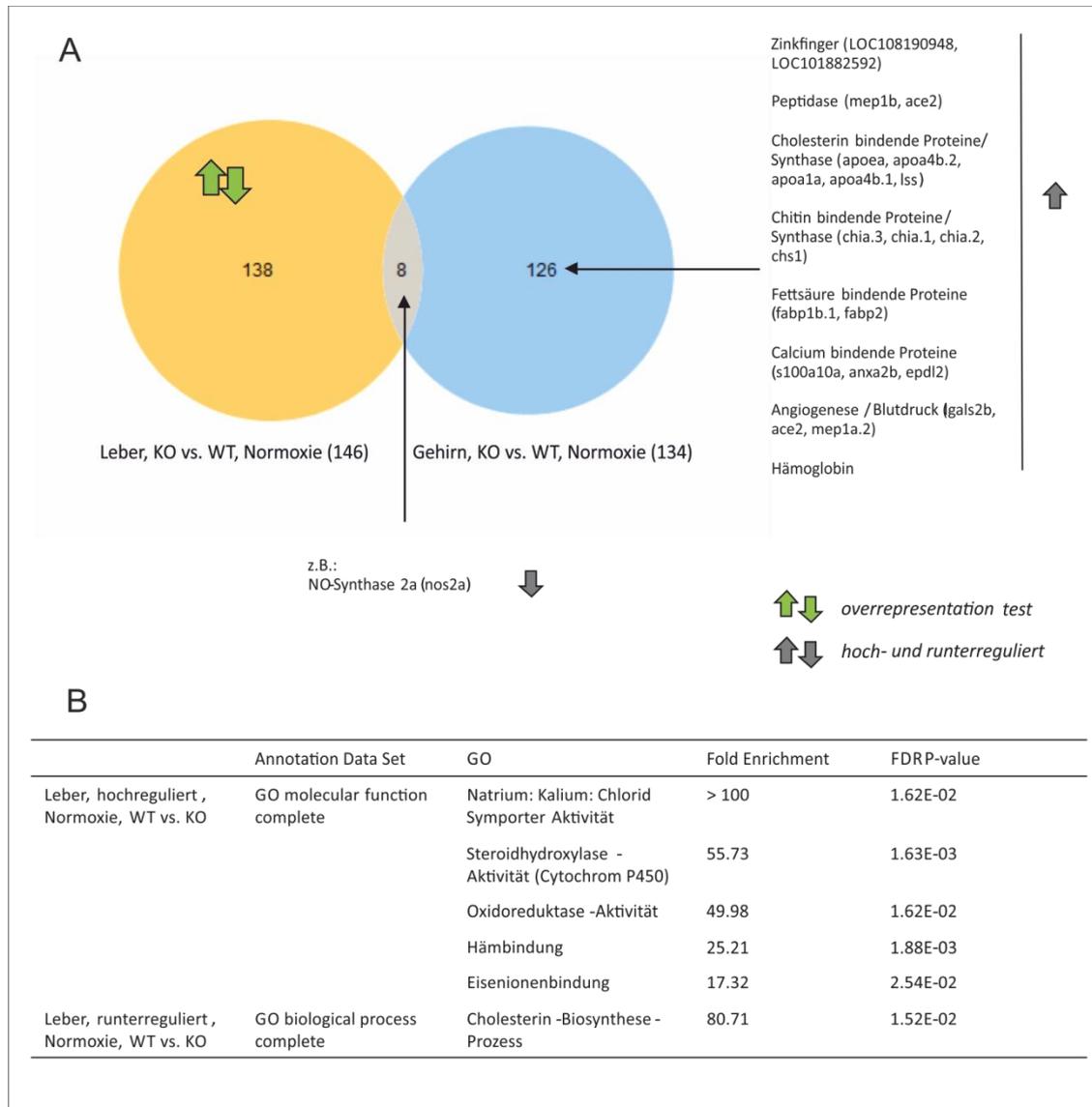


Abbildung 40 Umstellung der Genexpression als Anpassung an den *Cygb1*-Knockout in der Leber und im Gehirn unter Normoxie-Bedingungen

Dargestellt ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Transkriptomanalyse in der Leber und im Gehirn des *Cygb1*-Knockouts unter Normoxie-Bedingungen. (A) Anhand des Venn-Diagramms lässt sich die Anzahl der regulierten Gene innerhalb der unterschiedlichen Gewebe erkennen sowie die Schnittmenge der Gene, die in beiden Geweben reguliert werden. Im Gehirn konnten keine signifikant überrepräsentierten Gengruppen mit Hilfe des *statistical overrepresentation tests* ermittelt werden. Rechts neben dem Venn-Diagramm sind einige der Top 10-regulierten Gene im Gehirn dargestellt (Zinkfinger, Peptidasen, das Cholesterin bindende Protein *apoea*, das Calcium bindende Protein *s100a10a*) sowie relevante Gengruppen, in denen mehrere Gene reguliert werden (Fettsäure bindende Proteine, Chitin bindende Proteine, Angiogenese) und das respiratorische Protein Hämoglobin. (B) Die Ergebnisse des *statistical overrepresentation tests* sind als Tabelle zusammengefasst. In der Leber gab es hier sowohl

innerhalb der hochregulierten als auch innerhalb der runterregulierten Gene signifikant überrepräsentierte Gene mit ähnlichen Funktionen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine gewebespezifische Genregulation als Antwort auf den *Cygb1*-Knockout stattfindet. Es werden lediglich acht gleiche Gene in der Leber und im Gehirn reguliert. Obwohl die übrigen Gene gewebespezifisch reguliert werden, bestehen Parallelen zwischen den Geweben. So findet beispielsweise in beiden Geweben eine Umstellung des Cholesterin-Stoffwechsels und der Ion-Homöostase statt. Es gibt aber auch Genregulationen, die ausschließlich in einem der Gewebe stattfinden. So wird beispielweise Hämoglobin nur im Gehirn signifikant hochreguliert, was einem Sauerstoffmangel in diesem Gewebe vorbeugen könnte.

3.4.3.4 Umstellung der Genexpression als Anpassung an den *Cygb1*-Knockout unter Hypoxie-Bedingungen

Die durchgeführten Stressversuche (3.3) haben gezeigt, dass die Geneexpression von *Cygb1* besonderes unter Sauerstoffmangel hochreguliert wird. Um die Funktion von *Cygb1* innerhalb der Hypoxie-Antwort zu untersuchen, wurden Transkriptomte der Leber und des Gehirns unter Hypoxie-Bedingungen (~ 2 kPa, 48 Stunden) angefertigt. Ähnlich wie unter Normoxie-Bedingungen ist die Regulation der Genexpression unter Hypoxie-Bedingungen im *Cygb1*-Knockout gewebespezifisch. Dennoch werden sieben gleiche Gene in beiden Geweben reguliert (Abb. 41). Hierbei werden sechs Gene hochreguliert und nur ein Gen runterreguliert. Die hochregulierten Gene kodieren Protein, die zu der Familie der Vitellogenine gehören und als Vorläufer für Lipoproteine und Phosphoproteine fungieren. Das Genprodukt des runterregulierten Gens ist ein Lysozym, welches zur Proteinklasse der Hydrolasen gehört und durch eine antibakterielle Wirkung ein Teil des Immunsystems bildet. Die Anzahl der regulierten Gene ist in der Leber mit 130 Genen wesentlich höher als im Gehirn, in dem lediglich 52 Gene reguliert werden. In beiden Geweben sind sowohl bei den hochregulierten als auch bei den runterregulierten Genen signifikant überrepräsentierte Gene vorhanden, dessen Genprodukte ähnliche Funktionen aufweisen. Eine genauere Ausführung zur Hypoxie-Antwort, innerhalb der Leber und des Gehirns, ist unter den Punkten 3.4.3.4.1 und 3.4.3.4.2 aufgeführt.

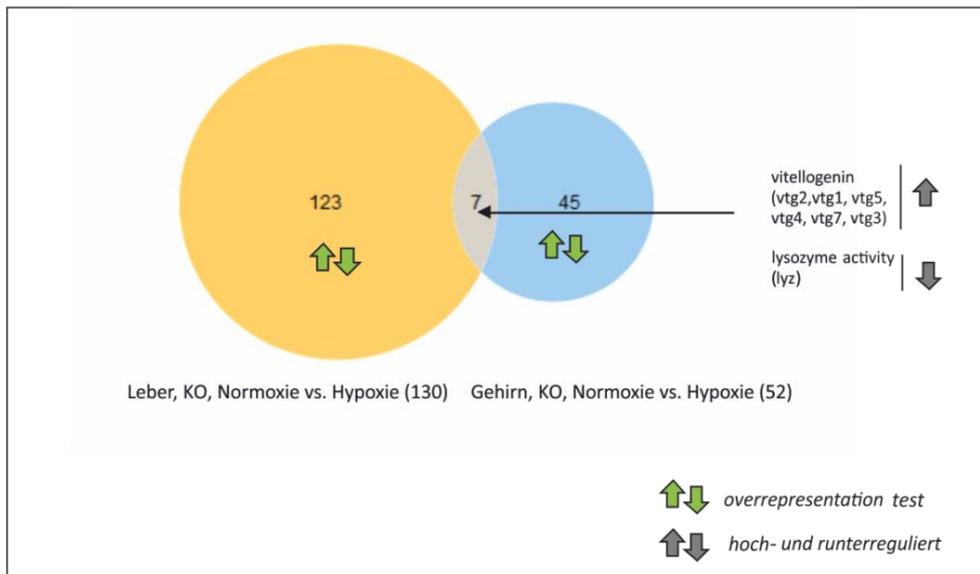


Abbildung 41 Transkriptomanalyse des *Cygb1*-Knockouts unter Hypoxie-Bedingungen in der Leber und im Gehirn

Dargestellt ist ein *Venn*-Diagramm, was die Anzahl der regulierten Gene innerhalb der Leber und des Gehirns unter Hypoxie-Bedingungen im *Cygb1*-Knockout verbildlicht. Sieben gleiche Gene werden sowohl in der Leber als auch im Gehirn reguliert. Die restlichen Gene zeigen eine gewebespezifische Regulation auf.

3.4.3.4.1 Verringerte Hypoxie-Antwort im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante im Vergleich zum *Cygb1*-Wildtypen

Eine 48-stündige Hypoxie mit einem Sauerstoffgehalt von 10 % (~2 kPa) führt im Gehirn des *Cygb1*-Knockouts zu einer abgeschwächten Hypoxie-Antwort im Vergleich zum *Cygb1*-Wildtypen. Im *Cygb1*-Wildtypen werden insgesamt 78 Gene reguliert, von denen 56 hoch- und 22 runterreguliert werden (Tab. 15). Innerhalb der hochregulierten Gene im *Cygb1*-Wildtypen, zeigt der *statistical overrepresentation test* sieben überrepräsentierte Gen-Gruppen, dessen Genprodukte ähnliche Funktionen aufweisen. Zu den regulierten Gen-Gruppen zählen Gene, die für Proteine kodieren, die eine Rolle in der klassischen Hypoxie-Antwort spielen. Hierzu zählen Sauerstoff transportierende und Sauerstoff bindende Proteine, die ein *fold enrichment* von >100 aufzeigen. Des Weiteren werden Haptoglobin und Häm bindende Proteine hochreguliert, die freie Hb-Moleküle und Häm-Gruppen binden können. Gene, dessen Genprodukte Peroxidase-Aktivitäten aufweisen werden ebenfalls hochreguliert, wodurch die Reduktion von giftigen Peroxiden gewährleistet wird. Organische Säuren werden mittels entsprechender Proteine unter Hypoxie-Bedingungen im *Cygb1*-Wildtypen gebunden. Darüber hinaus werden Gene hochreguliert, dessen Genprodukte an dem Transport von Lipid-Molekülen beteiligt sind.

Die spezifische Hypoxie-Antwort im *Cygb1*-Knockout ist mit 52 regulierten Genen geringer als die im *Cygb1*-Wildtypen. Von den 52 regulierten Genen werden 11 Gene hochreguliert und 41 Gene runterreguliert (Tab. 15). Innerhalb der hochregulierten und runterregulierten Gene unter Hypoxie-Bedingungen im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante konnten überrepräsentierte Gen-Gruppen ermittelt werden, dessen Genprodukte ähnliche Funktionen aufweisen (Abb. 42, B). Bei den hochregulierten Genen sind besonders Gene überrepräsentiert, dessen Genprodukte an dem Transport von Lipiden beteiligt sind. Runterreguliert werden Gene, dessen Genprodukte mit extrazellulären Matrixstrukturbestandteilen assoziiert sind. Außerdem werden Gene runterreguliert, die Proteine kodieren, die als Metalloendopeptidasen fungieren. Insgesamt werden 53 % (28 Gene) der regulierten Gene im Gehirn des *Cygb1*-Knockouts unter Hypoxie-Bedingungen auch im *Cygb1*-Knockout unter Normoxie-Bedingungen reguliert. Von diesen 28 Genen werden 26 Gene unter Normoxie-Bedingungen hochreguliert und unter Hypoxie-Bedingungen runterreguliert. Hierbei handelt es sich um Metalloendopeptidasen, Carboxypeptidasen, Chloridkanäle, Cholesterin-, Chitin-, Fettsäure-, Lipid-, Galactoside-, Calcium- und Häm bindende Proteine. Zu den Genen, die unter Normoxie-Bedingungen runterreguliert und unter Hypoxie-Bedingungen hochreguliert werden, zählt unter anderem ein Gen, das für Vesikelprotein Synaptoporin kodiert (Abb. 42). Obwohl sich die jeweiligen Hypoxie-Antworten im *Cygb1*-Wildtypen und *Cygb1*-Knockout erheblich voneinander unterscheiden, werden sechs gleiche Gene in beiden Gruppen reguliert. Zu diesen regulierten Genen zählen Gene, die für Vitellogenine kodieren, die als Vorläufer für Lipoproteine und Phosphoproteine fungieren und in beiden Genotypen hochreguliert werden.

Die Anzahl der regulierten Gene im Gehirn als Antwort auf die Hypoxie ist im *Cygb1*-Knockout geringer als im *Cygb1*-Wildtypen. Diese verringerte Hypoxie-Antwort lässt vermuten, dass in der *Cygb1*-Knockoutmutante unter Normoxie-Bedingungen Gene im Gehirn reguliert werden, dessen Genprodukte eine protektive Wirkung in Hinblick auf einen Sauerstoffmangel haben. In diesem Zusammenhang könnte die Hochregulation des Sauerstoff transportierenden Hämoglobins, in Kombination mit Genen, dessen Genprodukte für die Angiogenese und die Regulation des Blutdrucks zuständig sind (*Igals2b*, *ace2*, *mep1a.2*), von großer Bedeutung sein. Hämoglobin wird unter Hypoxie-Bedingungen auch im Gehirn des *Cygb1*-Wildtyps hochreguliert, wodurch vermutlich eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet wird (Abb. 42, A, Tab. 18).

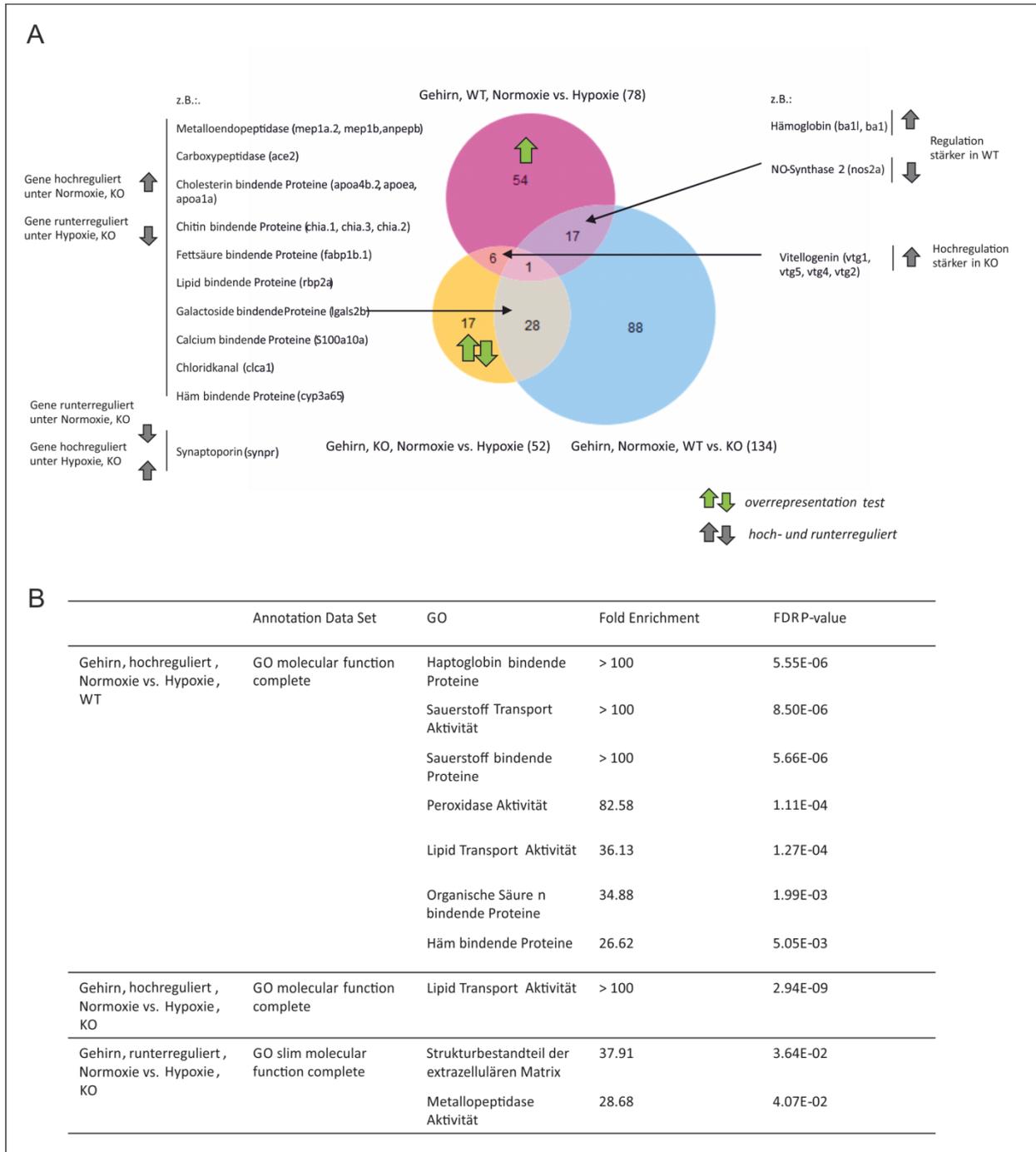


Abbildung 42 Transkriptomanalyse aller Vergleichsgruppen des Gehirns

Dargestellt ist (A) ein Venn-Diagramm, das alle regulierten Gene in allen Vergleichsgruppen im Gehirn anzeigt. Hierzu zählen die Vergleichsgruppen: Gehirn, *Cygb1*-Knockout, Normoxie vs. Hypoxie (gelb); Gehirn, *Cygb1*-Knockout vs. *Cygb1*-Wildtyp, Normoxie (blau); Gehirn, *Cygb1*-Wildtyp, Normoxie vs. Hypoxie (pink). Die Bereiche, die sich zwischen den Vergleichsgruppen überlappen, repräsentieren die gemeinsam regulierten Gene. Neben dem Venn-Diagramm sind einige relevante Gene aufgeführt und Gengruppen, in denen mehrere Gene reguliert werden. (B) Die signifikant überrepräsentierten Gene mit ähnlichen Funktionen, die mit Hilfe des *statistical overrepresentation tests* von PANTHER³² ermittelt wurden, sind in einer Tabelle zusammengefasst.

³² <http://www.pantherdb.org/> (25.04.2019)

3.4.3.4.2 Stärkere Hypoxie-Antwort in der Leber der *Cygb1*-Knockoutmutante als im *Cygb1*-Wildtypen

Die Hypoxie (~2 kPa O₂, Sauerstoffgehalt von ungefähr 10 %) von 48 Stunden führt in der Leber des *Cygb1*-Knockouts zu einer verstärkten Hypoxie-Antwort im Vergleich zum *Cygb1*-Wildtypen (Abb. 43, A). Im *Cygb1*-Wildtypen werden unter Hypoxie-Bedingungen typische Hypoxie-Gene wie Cytochrom P450 Proteine hochreguliert, die u.a. als Oxidoreduktase fungieren. Darüber hinaus werden unter Hypoxie-Bedingungen Gene im *Cygb1*-Wildtyp hochreguliert, dessen Genprodukte Cholesterin, Fettsäuren und Lipide binden können (si:ch211-285c6.4, *apoa4a*, *abca1b*, *rsad2*, *acot15*). Ähnlich wie Hämoglobin im Gehirn des *Cygb1*-Wildtyps wird in der Leber des *Cygb1*-Wildtyps Myoglobin mit einem *fold change* von 3,14 hochreguliert. Diese Regulation wird durch einen p-value von 5,87E-3 gestützt, wobei der FDR p-value (0,51) nicht signifikant ist (Tab. 18).

Die Hypoxie-Antwort im *Cygb1*-Knockout ist mit 130 regulierten Genen die stärkste Antwort in allen untersuchten Hypoxie-Vergleichsgruppen (Tab. 15). Von den regulierten Genen werden 113 hochreguliert und lediglich 17 runterreguliert. Sowohl innerhalb der hochregulierten als auch innerhalb der runterregulierten Gene konnten überrepräsentierte Gen-Gruppen ermittelt werden, dessen Genprodukte ähnlichen Funktionen aufweisen (Abb. 43, B). Zu den überrepräsentierten Gen-Gruppen, die hochreguliert werden, zählen Gene, die Lipid-Transportproteine und Protease-Inhibitoren kodieren. Runterreguliert werden außerdem Gene, die Na-K-2Cl-Cotransporter (NKCC) kodieren. Die runterregulierten NKCC assoziierten Gene werden im *Cygb1*-Knockout der Leber unter Normoxie-Bedingungen interessanterweise hochreguliert. Ähnlich wie im Gehirn werden in der Leber des *Cygb1*-Knockouts unter Normoxie-Bedingungen Gene hochreguliert, die unter Hypoxie-Bedingungen runterreguliert werden. Hierzu zählen, ähnlich wie im Gehirn, Gene, die Metallopeptidasen und Calcium und Cholesterin bindende Proteine kodieren. Darüber hinaus werden Gene unter Hypoxie-Bedingungen runterreguliert, dessen Genprodukte an der Natrium- und Kalium-Homöostase beteiligt sind. Zu den Genen, die unter Normoxie runterreguliert und unter Hypoxie hochreguliert werden, zählen u.a. Gene, die ein Calcium bindendes Protein sowie ein mRNA 3'-*end processing* Protein kodieren.

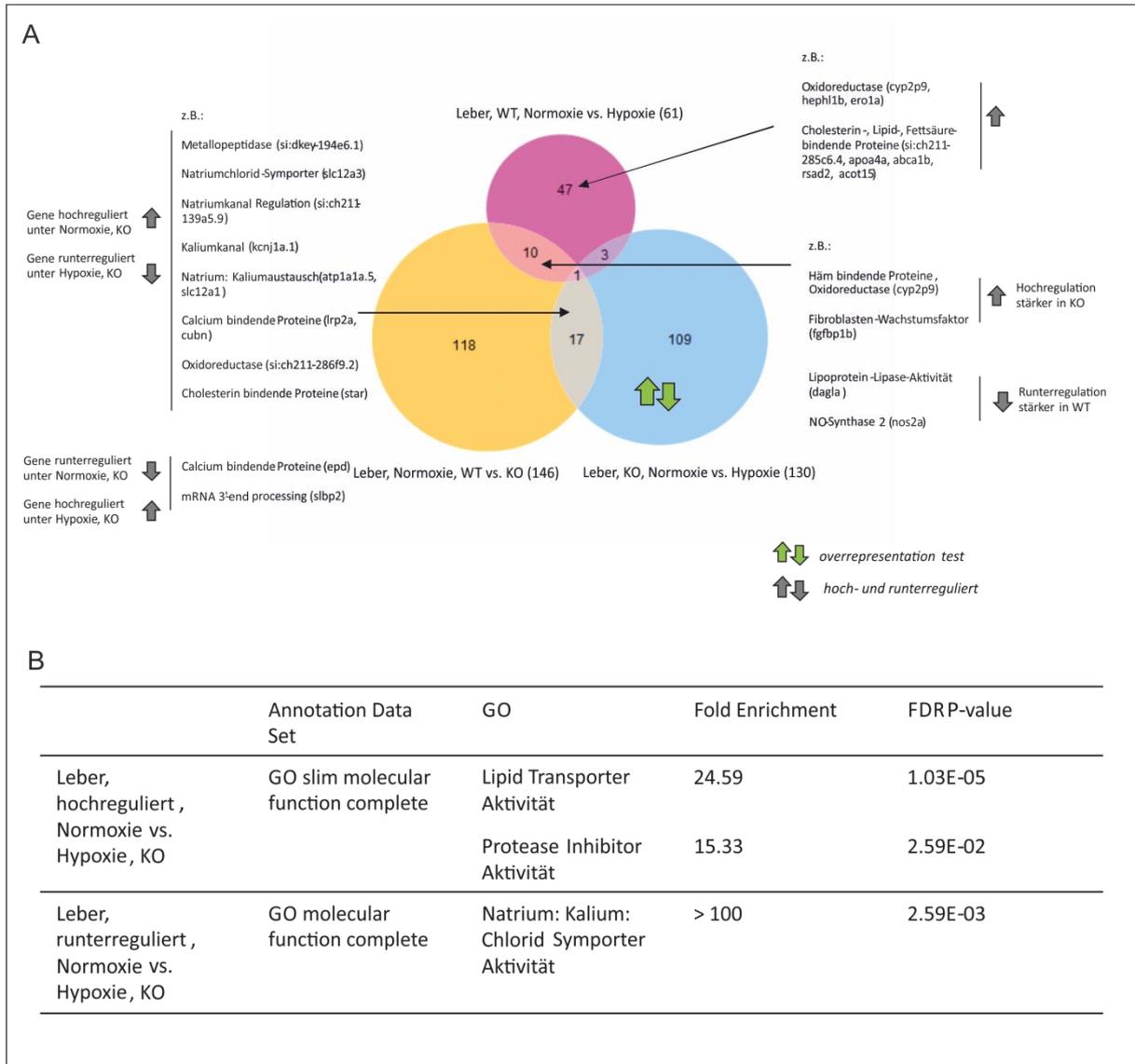


Abbildung 43 Transkriptomanalyse aller Vergleichsgruppen in der Leber

Dargestellt ist (A) ein Venn-Diagramm, das alle regulierten Gene in allen Vergleichsgruppen in der Leber anzeigt. Hierzu zählen die Vergleichsgruppen: Leber, *Cygb1*-Knockout, Normoxie vs. Hypoxie (blau); Leber, *Cygb1*-Knockout vs. *Cygb1*-Wildtyp, Normoxie (gelb); Leber, *Cygb1*-Wildtyp, Normoxie vs. Hypoxie (pink). Die Bereiche, die sich zwischen den Vergleichsgruppen überlappen, repräsentieren die gemeinsam regulierten Gene. Neben dem Venn-Diagramm sind einige relevante Gene aufgeführt und Gengruppen, in denen mehrere Gene reguliert werden. (B) Die signifikant überrepräsentierten Gene mit ähnlichen Funktionen, die mit Hilfe des *statistical overrepresentation tests* von PANTHER³³ ermittelt wurden, sind in einer Tabelle zusammengefasst.

In der Leber vom *Cygb1*-Wildtypen (Hypoxie) und im *Cygb1*-Knockout (Normoxie) werden 10 gleiche Gene reguliert (Abb. 43, A). Hierbei zählen zu den hochregulierten Genen *cyp2p9* und *fgfbp1b*, dessen Genprodukte als Häm bindendes Protein, Oxidoreduktase und Fibroblasten-

³³ <http://www.pantherdb.org/> (25.04.2019)

Wachstumsfaktor fungieren. Runterreguliert werden in diesen beiden Vergleichsgruppen u.a. eine Lipoproteinlipase, die die Hydrolyse von Lipoproteinen katalysiert, und die Nitric Oxide Synthase 2a, die Stickstoffmonoxid synthetisiert.

Die verstärkte Hypoxie-Antwort im *Cygb1*-Knockout im Vergleich zum *Cygb1*-Wildtypen könnte darauf zurückzuführen sein, dass unter Normoxie-Bedingungen in der Leber des *Cygb1*-Knockouts eine Vielzahl an *Cygb1*-Interaktionspartnern runterreguliert werden, aber (im Gegensatz zum Gehirn) wenige oder keine Gene hochreguliert werden, die die Funktion von *Cygb1* übernehmen und/oder vor einem Sauerstoffmangel schützen.

3.4.3.5 Genexpression von Globinen im *Cygb1*-Knockout und unter Hypoxie-Bedingungen im *Cygb1*-Wildtypen

Um zu untersuchen, ob eines der anderen Globine möglicherweise die Funktionen von *Cygb1* im Knockout übernimmt, wurde die Genexpression von *Cygb2*, Mb, Ngb, GbX und Hb im *Cygb1*-Knockout im Vergleich zum *Cygb1*-Wildtypen analysiert (Tab. 17). Deutlich zu erkennen ist, dass Hämoglobin unter Normoxie-Bedingungen im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante signifikant hochreguliert wird. Vermutlich kompensiert Hämoglobin das Fehlen von *Cygb1* im Gehirn und übernimmt partiell Funktionen von *Cygb1*. Darüber hinaus wird keines der anderen Globine im *Cygb1*-Knockout signifikant reguliert. Auch die Genexpression von *Cygb2* wird weder unter Normoxie-Bedingungen noch unter Hypoxie-Bedingungen in der Leber oder im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante reguliert. Dies spricht dafür, dass *Cygb1* und *Cygb2* unterschiedliche Funktionen ausüben.

Tabelle 17 Übersicht der Regulation der Genexpression von anderen Globinen in der *Cygb1*-Knockoutmutante unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen

Globin	Genotyp	Versuch	Gewebe	Fold change	FDR p-value
<i>Cygb2</i>	WT vs. KO	Normoxie	Gehirn	-1,17	1,00
			Leber	-2,61	1,00
	KO	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	1,20	1,00
			Leber	-1,31	1,00
Mb	WT vs. KO	Normoxie	Gehirn	-1,37	1,00
			Leber	1,79	1,00
	KO	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	-2,31	1,00
			Leber	1,08	1,00
Ngb	WT vs. KO	Normoxie	Gehirn	-1,34	1,00
			Leber	-1,47	1,00
	KO	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	1,24	1,00
			Leber	5,07	1,00
GbX	WT vs. KO	Normoxie	Gehirn	1,61	1,00
			Leber	-3,66	1,00
	KO	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	-1,31	1,00
			Leber	5,08	1,00
Hb (subunit beta)	WT vs. KO	Normoxie	Gehirn	3,13	2,10E-3
			Leber	1,11	1,00
	KO	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	1,12	1,00
			Leber	-1,40	1,00

Da Globine als respiratorische Proteine an der Sauerstoffspeicherung und am Sauerstofftransport beteiligt sind und dies auch unter Sauerstoffmangel-Bedingungen unabdingbar ist, wurde die Genexpression verschiedener Globine unter Hypoxie-Bedingungen im *Cygb1*-Wildtypen analysiert (Tab. 18). Im Gehirn der *Cygb1*-Wildtypen wird die Genexpression von Hämoglobin signifikant hochreguliert. Darüber hinaus wird Myoglobin in der Leber des *Cygb1*-Wildtyps unter Hypoxie-Bedingungen hochreguliert (*fold change* 3,14). Diese Regulation zeigt allerdings keinen signifikanten FDR p-value-Wert (0,51), wird aber durch einen signifikanten p-value von 5,87E-3 gestützt. Überraschenderweise wird die Genexpression der duplizierten *Cygb*-Gene nicht signifikant hochreguliert. Die unter dem Punkt 3.3.1 aufgeführten Hypoxie-Versuche zeigen für *Cygb1* eine signifikante Hochregulation der Genexpression in der Leber und im Gehirn auf. *Cygb2* wird in den oben aufgeführten Hypoxie-Versuchen (3.3.1)

signifikant in der Leber hochreguliert. Möglicherweise sind diese Unterschiede auf die verschiedenen Methoden zurückzuführen.

Tabelle 18 Übersicht der Regulation der Genexpression von Globinen im *Cygb1*-Wildtypen unter Hypoxie-Bedingungen

Globin	Genotyp	Versuch	Gewebe	Fold change	FDR p-value	p-value
<i>Cygb1</i>	WT	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	1,06	1,00	0,77
			Leber	2,12	1,00	0,06
<i>Cygb2</i>	WT	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	-1,07	1,00	0,58
			Leber	-1,19	1,00	0,86
Mb	WT	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	1,35	1,00	0,64
			Leber	3,14	0,51	5,87E-3
Ngb	WT	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	-1,12	1,00	0,41
			Leber	1,67	1,00	0,68
GbX	WT	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	-1,14	1,00	0,71
			Leber	-4,07	1,00	0,45
Hb (subunit beta)	WT	Normoxie vs. Hypoxie	Gehirn	5,32	0,00	0,00
			Leber	-1,21	0,64	1,00

3.5 Multiple Myoglobin-Gene in Flösselhechtartigen (Polypteriformes)

Während die meisten Vertebraten nur ein *single copy* Mb besitzen, weisen einige Fische multiple Mb-Gene auf. Im Rahmen dieser Arbeit konnten sowohl im Senegal-Flösselhecht (*Polypterus senegalus*) als auch im Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*) 15 multiple Mb-Gene identifiziert werden. Zunächst wurden die multiplen Mb-Gene bioinformatisch ermittelt. Zur Verifizierung wurden die Mb-Gene des Senegal-Flösselhechts und des Flösselaals mittels PCR amplifiziert und vor einer Sanger Sequenzierung in pGEM-T inkloniert. Die multiplen Mb-Sequenzen sind unter den Punkten 3.5.2.1 und 3.5.3.1 aufgeführt. Um erste Hinweise auf die Funktion und das evolutionäre Schicksal der multiplen Mb-Gene zu erhalten, wurde die Expression der Gene mittels qRT-PCR und RNA-Seq (3.5.2.2, 3.5.3.2) untersucht und die phylogenetische Entwicklung mit Hilfe eines Stammbaums (3.5.1) eruiert.

3.5.1 Phylogenie der multiplen Mb-Gene

Im Gegensatz zu den meisten Vertebraten weisen einige Fische multiple Mb-Gene auf. So konnten im Karpfen (*Cyprinus carpio*) und im Goldfisch (*Carassius auratus*) zwei Mb-Gene (Mb1 und Mb2) (Fraser et al. 2006; Roesner et al. 2008), im Silbergabelbart (*Osteoglossum bicirrhosum*) und im asiatischen Gabelbart (*Scleropages formosus*) drei Mb-Gene (Mba, Mbβ, Mby) (Gallagher und Macqueen 2017), im Westafrikanischen Lungenfisch (*Protopterus annectens*) sieben Mb-Gene (PanMb1-7) (Koch et al. 2016) und im Froschwels (*Clarias batrachus*) 15 Mb-Gene (Li et al. 2018) beschrieben werden. Mittels bioinformatischer Untersuchungen verschiedener SRA-Transkriptom-Datensätze (Anhang Tab. 1) konnten im Rahmen dieser Arbeit im Senegal-Flösselhecht (*Polypterus senegalus*) und im Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*) jeweils 15 multiple Mb-Gene identifiziert werden. Um den Ursprung und die evolutionäre Entwicklung der multiplen Mb-Gene in den verschiedenen Fischen zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Stammbaum mit allen bekannten multiplen Mb-Genen, unter Verwendung von MrBayes (2.8.3), erstellt. Als Außengruppe wurde die Australische Pflughnasenchimäre verwendet, die zu den Knorpelfischen (Chondrichthyes) gehört und ein *single copy* Mb besitzt. Die multiplen Mb-Gene des Froschwelses wurden für diesen Stammbaum teilweise verkürzt, da die gesamten Mb-Sequenzen Unstimmigkeiten aufweisen (Anhang Abb. 3). Der resultierende Konsensusbaum ist in Abbildung 44 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Mb-Gene vom Lungenfisch, die der Flösselhechtartigen und die der Teleostei jeweils in einem monophyletischen Verhältnis zueinander stehen. Die multiplen Mb-Gene in den Flösselhechtartigen, den Karpfenartigen und den Gabelbartartigen sind jeweils im letzten gemeinsamen Vorfahren entstanden. Das wird dadurch ersichtlich, dass die multiplen Mb-Gene der verschiedenen Arten innerhalb der unterschiedlichen Ordnungen teilweise Schwesterngruppen bilden. Im Froschwels sind die duplizierten Mb-Gene anscheinend nicht im letzten gemeinsamen Vorfahren der Welsartigen entstanden, sondern ausschließlich im Froschwels selbst. In den Lachsartigen (hier durch die Regenbogenforelle und durch den Atlantischen Lachs vertreten), in denen es zu einer spezifischen WGD gekommen ist (Macqueen und Johnston 2014; Lien et al. 2016), weist nur die Regenbogenforelle duplizierte Mb-Kopien auf.

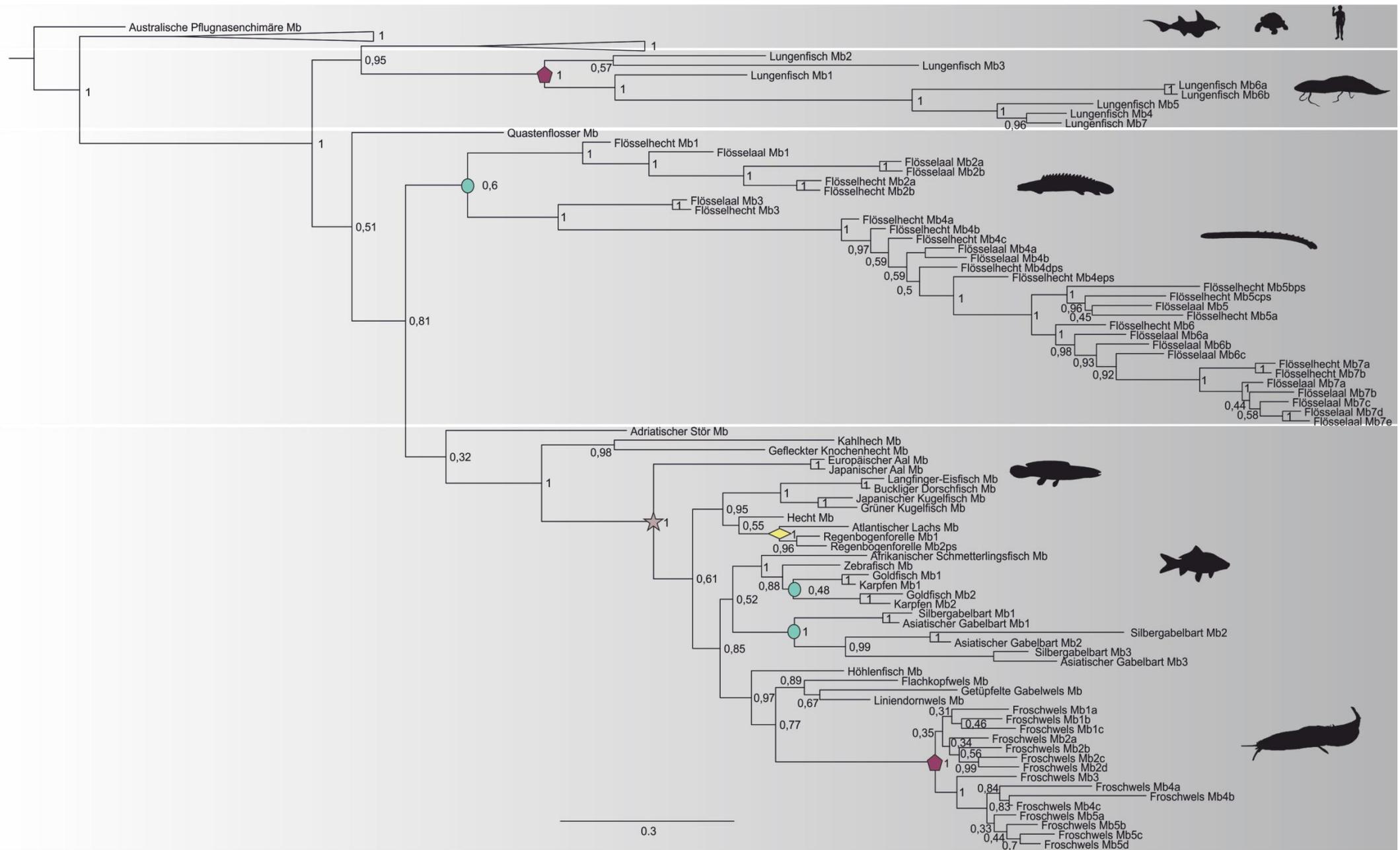


Abbildung 44 Phylogenie multipler Mb-Gene in Knochenfischen (Osteichthyes)

Dargestellt sind die phylogenetischen Verhältnisse von multiplen Mb-Genen innerhalb der Knochenfische (Osteichthyes). Die Berechnung des Stammbaums wurde mittels Bayes'scher Analyse unter Verwendung des Dayhoff+I+G-Modells durchgeführt. Es wurden 5 Millionen Generationen durchlaufen, von denen die ersten 25 % nach Beendigung eliminiert wurden. Als Außengruppe dient die *single copy* Mb-Sequenz der Australischen Pflugnasenchimäre. Der unten aufgeführte Balken repräsentiert 0,3 Substitutionen pro Aminosäureposition. Die Kladen der Tetrapoden sind kollabiert dargestellt. Markiert sind die tsWGD (☆), die ssWGD (◊) sowie die Entstehung von multiplen Mb-Genen im letzten gemeinsamen Vorfahren (●) oder ausschließlich in der Art selbst (◆).

3.5.2 Multiple Mb-Gene im Senegal-Flösselhecht (*Polypterus senegalus*)

3.5.2.1 Sequenzvergleich der multiplen Mb-Gene im Senegal-Flösselhecht

Um Ähnlichkeiten und Unterschiede der multiplen Mb-Gene im Flösselhecht (PseMb) zu untersuchen, wurden mit Hilfe von GeneDoc (2.8.2) Aminosäuresequenz-Alignments erstellt (Abb. 45). In dem Alignment sind die konservierten Aminosäuren (100 % konserviert: schwarz, 75 % konserviert: dunkelgrau, 50 % konserviert: grau) hervorgehoben und die Sekundärstruktur, die anhand der *single copy* Mb-Sequenz des Pottwals (PcaMb) erstellt wurde, ist in Form der α -Helices (Helix A-H) über dem Alignment aufgeführt.

Im Durchschnitt sind die multiplen Mb-Sequenzen des Flösselhechts 148 AS (± 21 AS) lang, wobei das Pseudogen PseMb4dps mit 127 AS am kürzesten ist und PseMb4a, PseMb4b und PseMb6 mit 152 AS die längsten Aminosäuresequenzen zeigen. Die multiplen Mb-Gene sind untereinander im Durchschnitt zu 61 % identisch. Die höchste Übereinstimmung weisen PseMb2a und PseMb2b mit 92 % auf. PseMb1 und PseMb5bps stimmen lediglich zu 33 % überein. Die Ähnlichkeit zum *single copy* Gen vom Pottwal liegt im Durchschnitt bei 35 %. Hierbei zeigt PseMb1 mit 47 % Übereinstimmung die höchste Ähnlichkeit und PseMb5bps mit 27 % die geringste Ähnlichkeit zur *single copy* Sequenz des Pottwals auf.

Die für die Sauerstoffbindung essentiellen Aminosäuren Phenylalanin an Position CD1 (erste Aminosäure der interhelikalen Region zwischen der C- und der D-Helix) sowie das Histidin an Position E7 sind in allen multiplen Mb-Sequenzen vorhanden. Beim PseMb5bps kam es allerdings zum Verlust von Histidin an Position F8, was zu einer funktionellen Pseudogenisierung führte. In drei weiteren PseMb-Sequenzen kam es ebenfalls zur Pseudogenisierung. Hierbei kam es bei PseMb4dps und PseMb5cps zum Einbau von verfrühten Stoppcodons und bei PseMb4eps zum Verlust eines Startcodons. Die typische Globin-Faltung („3-über-3- α helikale Sandwichstruktur“, Helix A-H) wird vermutlich trotz dessen in allen multiplen Mb-Genen ausgebildet.

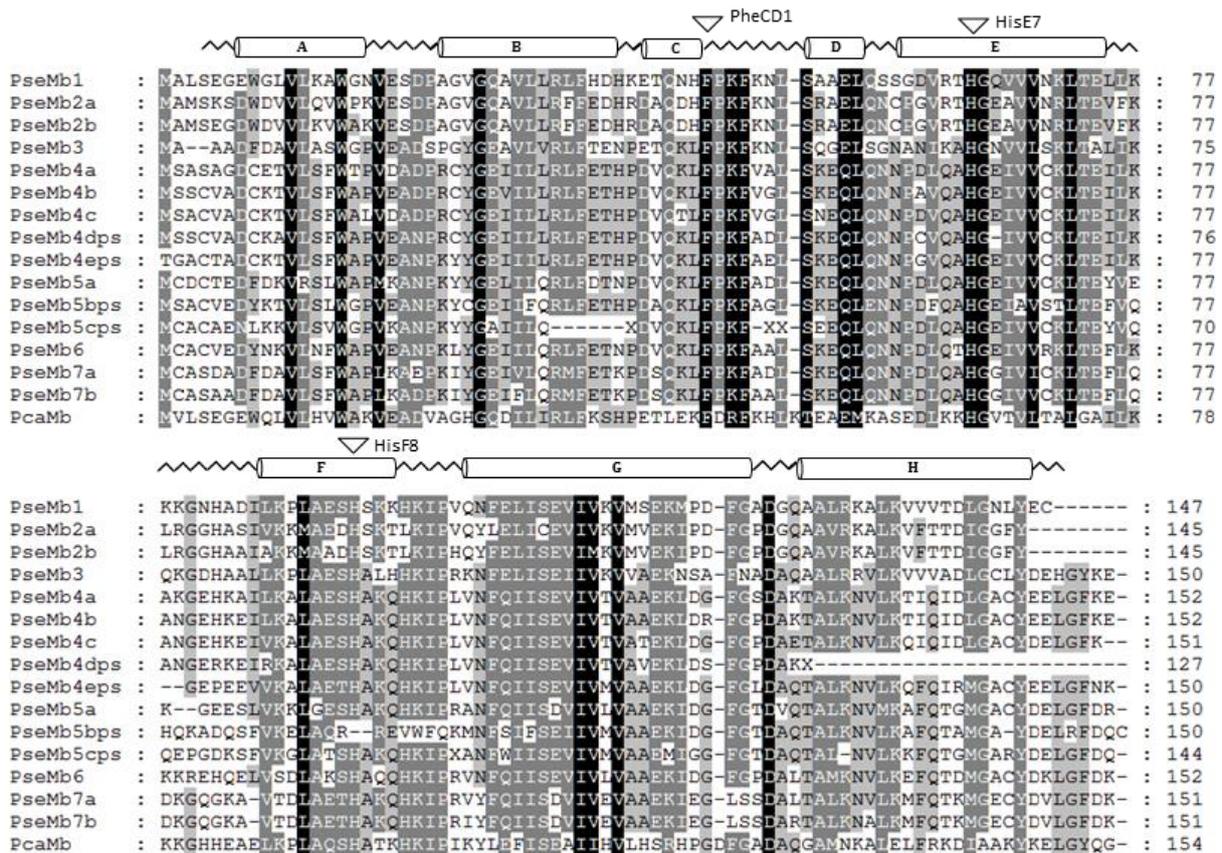


Abbildung 45 Aminosäuresequenz-Alignment der multiplen Mb-Gene vom Senegal-Flösselhecht

Dargestellt sind die 15 multiplen Mb-Gene vom Senegal-Flösselhecht (PseMb). Als *single copy* Referenzsequenz fungiert Mb des Pottwals (Pca). Die konservierten Bereiche sind in Schwarz (100 %), Dunkelgrau (75 %) und Grau (50 %) unterlegt. Die α -Helices (Helix A-H) sind über dem Alignment aufgeführt. Die konservierten Aminosäuren PheCD1, HisE7 und HisF8 sind durch Pfeile markiert.

3.5.2.2 Genexpression der multiplen Mb-Gene im Senegal-Flösselhecht

Genexpressionsanalysen der multiplen Mb-Gene des Senegal-Flösselhechts wurden mittels qRT-PCR (Abb. 46) und RNA-Mapping (Abb. 47) durchgeführt. Die Genexpressionsanalysen können, neben der Beschreibung des Expressionsmusters zu einem besseren Verständnis des evolutionären Schicksals der multiplen Mb-Sequenzen im Senegal-Flösselhecht führen. Hierbei lässt sich erkennen, ob die multiplen Mb-Gene möglicherweise einen additiven Effekt ausüben (hierfür würden die entsprechenden Gene verstärkt in einem Gewebe exprimiert werden) oder eher eine Sub- oder Neofunktionalisierung vorliegt (alle Gene würden unterschiedliche Expressionsmuster aufzeigen). Eine Genexpressionsanalyse von PseMb4a und PseMb7b mittels qRT-PCR wurde nicht durchgeführt, da sich die Sequenzen für die spezifische Klonierung zu ähnlich sind.

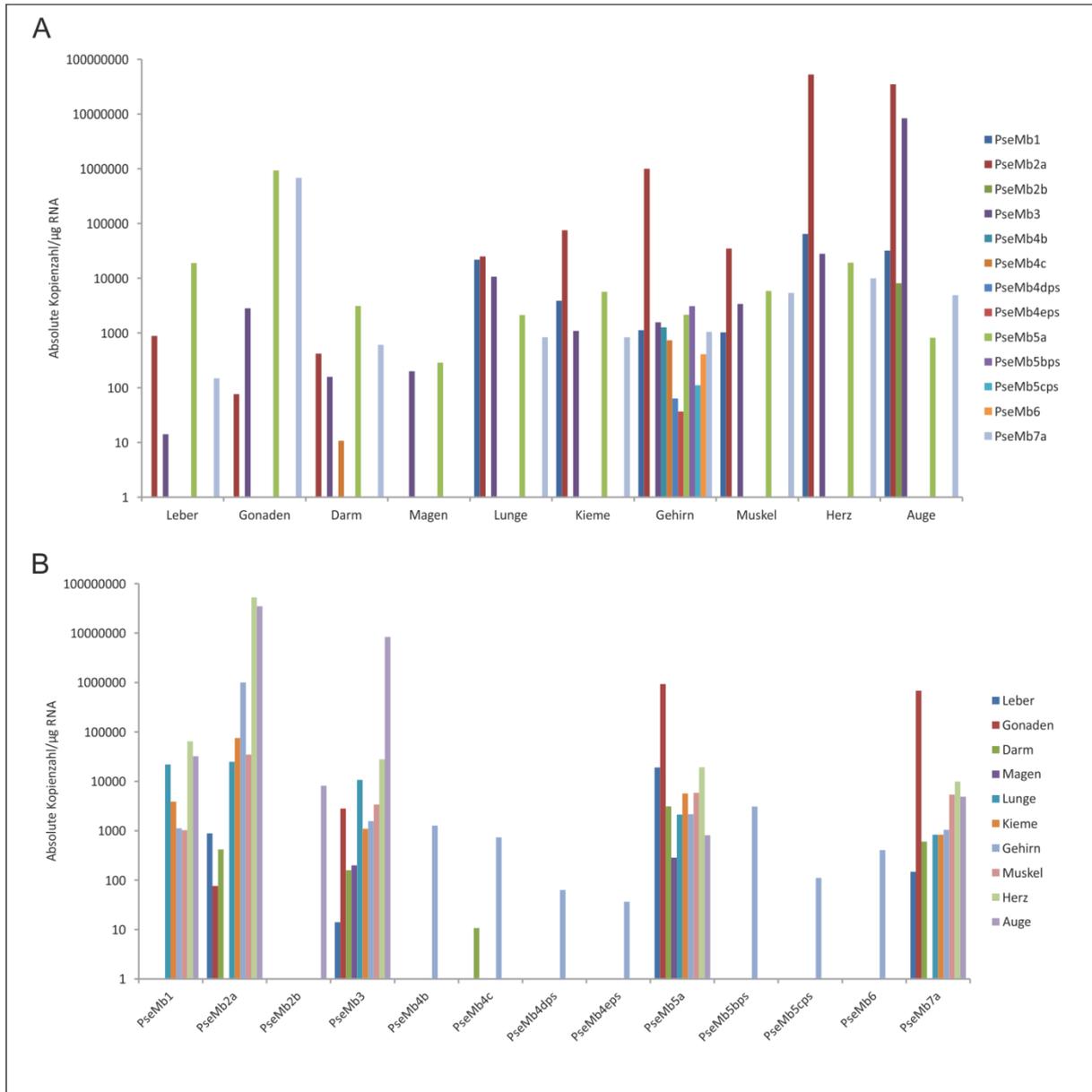


Abbildung 46 Genexpressionsanalyse der multiplen Mb-Gene des Senegal-Flösselhechts mittels qRT-PCR

Dargestellt ist die Genexpression der multiplen Mb-Gene des Senegal-Flösselhechts in verschiedenen Geweben. Die Genexpression ist als absolute Kopienzahl pro μ g RNA auf einer logarithmierten Achse dargestellt. Die Genexpression ist in Abhängigkeit der verschiedenen Gewebe (A) und in Abhängigkeit der PseMb-Gene (B) dargestellt.

Anhand der Genexpressionsanalyse lässt sich erkennen, dass, mit Ausnahme von PseMb2b, alle multiplen PseMb-Gene im Gehirn des Senegal-Flösselhechts exprimiert werden (Abb. 46, A). Hierbei unterscheidet sich die Stärke der Expression zwischen den einzelnen PseMb-Genen erheblich. PseMb2a wird am stärksten exprimiert, wohingegen die anderen PseMb-Gene in wesentlich geringeren Mengen vorliegen. Auch die Pseudogene PseMb4dps, PseMb4eps,

PseMb5bps und PseMb5cps werden im Gehirn exprimiert. In den anderen Geweben werden eher vereinzelt PseMb-Gene exprimiert, wobei sich die Anzahl der Gene, die in weiteren Geweben exprimiert werden, auf fünf beschränkt (Abb. 46, B). Hierbei handelt es sich um PseMb1, PseMb2a, PseMb3, PseMb5a und PseMb7a. PseMb3 und PseMb5 werden in allen untersuchten Geweben exprimiert, PseMb2a und PseMb7a werden in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme des Magens exprimiert. PseMb1 wird nur in einzelnen Geweben exprimiert und hat ein Expressionsmaximum im Herzen. PseMb2a hat ein Expressionsmaximum im Herzen und zeigt ähnlich wie PseMb3 einen hohen Expressionswert im Auge auf. PseMb5a und PseMb7a werden am stärksten in den Gonaden exprimiert. Insgesamt sind die höchsten Expressionswerte im Herzen (PseMb2a), im Auge (PseMb2a und PseMb3), im Gehirn (PseMb2a) und in den Gonaden (PseMb5a und PseMb7a) messbar.

Die Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR deuten darauf hin, dass die multiplen PseMb-Gene möglicherweise einen additiven Effekt im Gehirn des Senegal-Flösselhechts ausüben könnten. PseMb1, PseMb2a, PseMb3, PseMb5a und PseMb7a haben vermutlich zusätzliche Funktionen entwickelt.

Anhand von frei zugänglichen SRA-Datensätzen konnte die Expression der multiplen PseMb-Sequenzen in sich entwickelndem Knochengewebe, in einer sich regenerierenden Brustflosse und in einem Gemisch aus Herzen, Leber, Milz, Nieren und Gehirn untersucht werden (Abb. 47). Die Genexpression innerhalb des Gewebegemisches zeigt hohe Expressionswerte für PseMb7a, PseMb7b und überraschenderweise auch für PseMb6 und PseMb4b (Abb. 47, A). Eine hohe und breitgefächerte Expression von PseMb7a wurde bereits mittels qRT-PCR ermittelt. PseMb7b könnte möglicherweise ein ähnliches Expressionsmuster wie PseMb7a aufzeigen. Die hohen Expressionswerte von PseMb4b und PseMb6 könnten auf eine Expression in der Milz oder in den Nieren zurückzuführen sein, da diese Gewebe nicht mittels qRT-PCR untersucht wurden. Die Expressionsuntersuchung in dem sich entwickelnden Knochengewebe und in einer sich regenerierenden Brustflosse zeigen ein ähnliches Bild (Abb. 47, B, C). In beiden Expressionsanalysen wird PseMb1 am stärksten exprimiert und PseMb2b liegt in geringen Mengen vor. Das könnte darauf hindeuten, dass PseMb1 und möglicherweise auch PseMb2b, an der Proliferation von Geweben beteiligt ist.

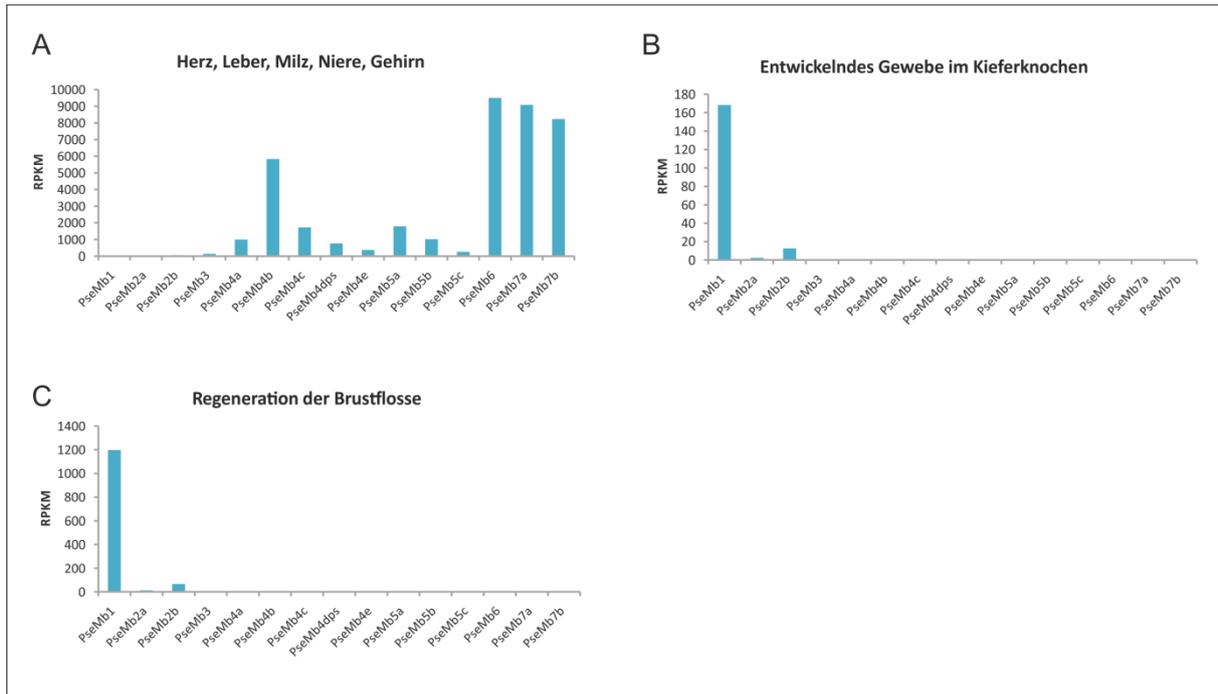


Abbildung 47 Genexpressionsanalyse der multiplen Mb-Gene des Senegal-Flösselhechts mittels RNA-Mapping

Dargestellt ist die Genexpression der multiplen Mb-Gene des Senegal-Flösselhechts in einem Gemisch aus Herzen, Leber, Milz, Niere und Gehirn (A), in einem sich entwickelnden Kieferknochen (B) und in einer sich regenerierenden Brustflosse (14 dpf) (C). Die Stärke der Expression ist in Form des RPKM-Wertes (*Reads per kilobase of exon model per million mapped Reads*) angegeben. Das Mapping wurde mit der CLC-Workbench durchgeführt und die Reads mussten mit 95 % ihrer Länge und ihrer Sequenz mit der Referenzsequenz übereinstimmen.

3.5.3 Multiple Mb-Gene im Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*)

3.5.3.1 Sequenzvergleich der multiplen Mb-Gene im Flösselaal

Um Ähnlichkeiten und Unterschiede der multiplen Mb-Gene des Flösselaals (EcaMb) zu untersuchen, wurden mit Hilfe von GeneDoc (2.8.2) Aminosäuresequenz-Alignments erstellt (Abb. 48). In dem Alignment sind die konservierten Aminosäuren (100 % konserviert: schwarz, 75 % konserviert: dunkelgrau, 50 % konserviert: grau) hervorgehoben und die Sekundärstruktur, die anhand der *single copy* Mb-Sequenz des Pottwals (PcaMb) erstellt wurde, ist in Form der α -Helices (Helix A-H) über dem Alignment aufgeführt.

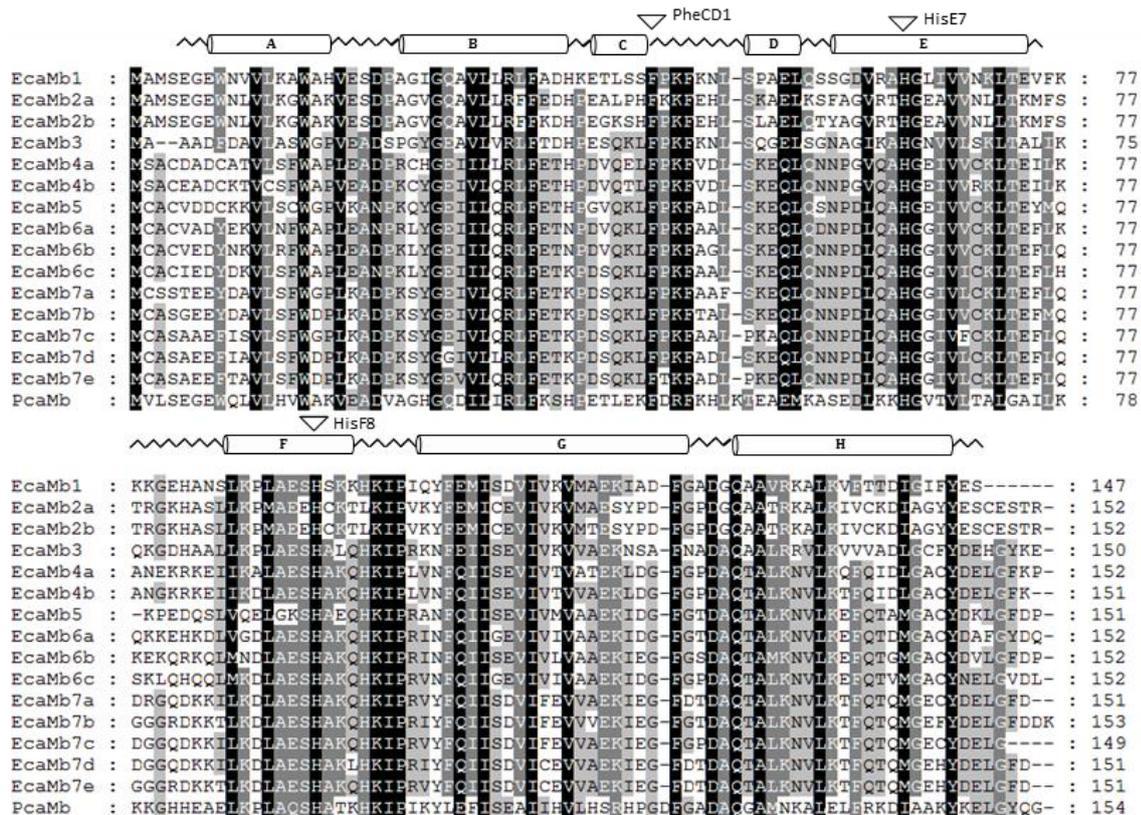


Abbildung 48 Aminosäuresequenz-Alignment der multiplen Mb-Gene vom Flösselaal

Dargestellt sind die 15 multiplen Mb-Gene des Flösselaals (EcaMb). Als *single copy* Referenzsequenz fungiert Mb des Pottwals (Pca). Die konservierten Bereiche sind in Schwarz (100 %), Dunkelgrau (75 %) und Grau (50 %) unterlegt. Die α -Helices (Helix A-H) sind über dem Alignment aufgeführt. Die konservierten Aminosäuren PheCD1, HisE7 und HisF8 sind durch Pfeile markiert.

Die multiplen EcaMb-Gene sind im Durchschnitt 151 AS (± 4 AS) lang, wobei EcaMb1 mit 147 AS die kürzeste und EcaMb7 mit 153 AS die längste Aminosäuresequenz aufweist. Die für die Sauerstoffbindung essentiellen Aminosäuren Phenylalanin an Position CD1 (erste Aminosäure der interhelikalen Region zwischen der C- und der D-Helix) sowie die Histidine an Position E7 und F8 sind in allen multiplen Mb-Genen vorhanden. Die typische Globin-Faltung („3-über-3- α helikale Sandwichstruktur“) in der Sekundärstruktur (Helix A-H) wird in allen multiplen EcaMb-Genen ausgebildet. Durchschnittlich stimmen die Mb-Gene des Flösselaals mit der *single copy* Mb-Sequenz des Pottwals zu 39,7 % ($\pm 8,3$ %) überein. Mit 48 % ist EcaMb1 der *single copy* Mb-Sequenz des Pottwals am ähnlichsten, wohingegen EcaMb5 mit 32 % die höchste Divergenz zu PcaMb aufzeigt. Die multiplen EcaMb-Gene sind untereinander im Durchschnitt zu 57 % identisch. Hierbei weisen EcaMb2a und EcaMb2b die höchste Übereinstimmung mit 93 % auf. Die größte Divergenz besteht mit 32 % zwischen EcaMb2b und EcaMb5 und EcaMb7e.

3.5.3.2 Genexpression der multiplen Mb-Gene im Flösselaal

Die Genexpression der multiplen Mb-Gene des Flösselaals wurde ähnlich wie beim Flösselhecht mittels qRT-PCR (Abb. 49) und RNA-Mapping (Abb. 50) untersucht. Die Analyse sollte neben der Beschreibung des Expressionsmusters zu einem besseren Verständnis des evolutionären Schicksals der multiplen Mb-Gene im Flösselaal führen. Ähnlich wie beim Senegal-Flösselhecht können hierfür anhand des Expressionsmusters erste Hinweise gesammelt werden, die Aufschluss über die Entwicklung der Gene nach der Duplikation geben (z.B. additiven Effekt, Sub- oder Neofunktionalisierung). Eine Genexpressionsanalyse von EcaMb2, Eca7d und Eca7e mittels qRT-PCR wurde nicht durchgeführt, da sich die Sequenzen für die spezifische Klonierung zu ähnlich sind.

Die Genexpressionsanalyse der multiplen Mb-Gene des Flösselaals mittels qRT-PCR zeigt, dass alle untersuchten Mb-Gene exprimiert werden und das in nahezu allen untersuchten Geweben (Abb. 49, A). Die multiplen EcaMb-Gene unterscheiden sich allerdings in der Stärke der Expression. EcaMb4a, EcaMb6c, EcaMb7a und EcaMb7c sind die EcaMb-Gene mit der geringsten Expression. Die höchsten Expressionswerte zeigen EcaMb1, EcaMb2b und EcaMb3. EcaMb1 hat ein Expressionsmaximum im Herzen und in der Lunge, gefolgt von hohen Expressionswerten in den Kiemen, der Muskulatur und den Augen. EcaMb2b wird am stärksten in den Kiemen, im Herzen und im Gehirn exprimiert. EcaMb3 zeigt ein klares Expressionsmaximum in den Augen, gefolgt von einer starken Expression im Gehirn. EcaMb4b, EcaMb5, EcaMb6a, EcaMb6b und EcaMb7b zeigen im Vergleich zu den restlichen EcaMb-Genen eine durchschnittliche Genexpressionsstärke auf (Abb. 49, B).

Die Genexpressionsmuster der multiplen Mb-Gene des Flösselaals deuten darauf hin, dass einige der Mb-Gene (z.B. EcaMb1, EcaMb2b und EcaMb3) möglicherweise eigenständige Funktionen entwickelt haben. Da die meisten EcaMb-Gene in nahezu allen Geweben exprimiert werden, lässt sich ein additiver Effekt nicht ausschließen.

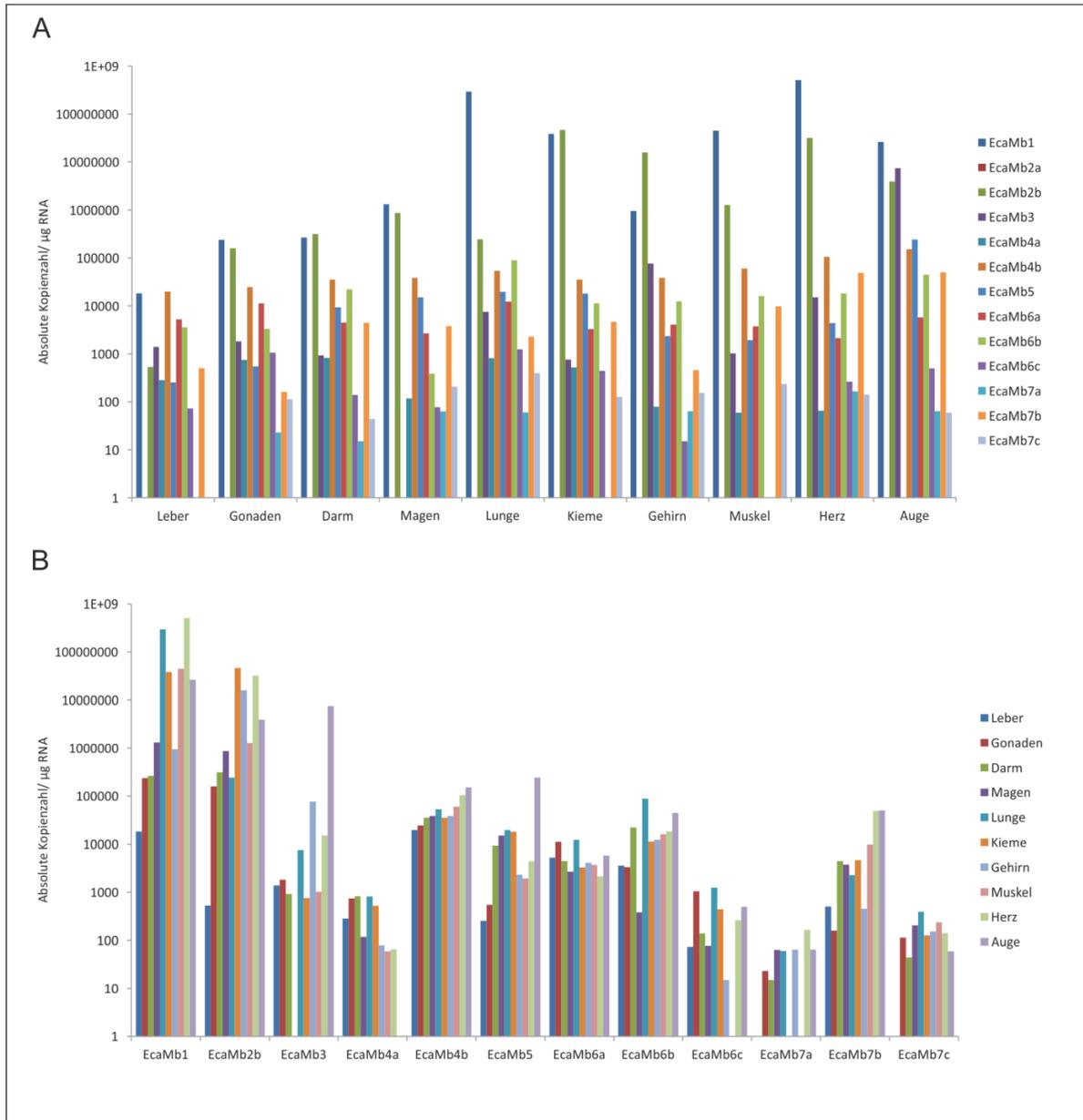


Abbildung 49 Genexpressionsanalyse der multiplen Mb-Gene im Flösselaal mittels qRT-PCR

Dargestellt ist die Genexpression der multiplen Mb-Gene im Flösselaal in verschiedenen Geweben. Die Genexpression ist als absolute Kopienzahl pro µg RNA auf einer logarithmierten Achse dargestellt. Die Genexpression ist in Abhängigkeit der verschiedenen Gewebe (A) und in Abhängigkeit der EcaMb-Gene (B) dargestellt.

Anhand von frei zugänglichen SRA-Datensätzen konnte die Expression der multiplen EcaMb-Gene in den Kiemen, der Leber und in einem Gemisch aus Kiemen, Gehirn, Leber und Ovarien untersucht werden (Abb. 50). Ähnlich wie bei den qRT-PCR Ergebnissen zeigen EcaMb1 und EcaMb2b die stärkste Expression der multiplen EcaMb-Gene in den Kiemen auf (Abb. 50, A). In der Leber ist die Expression sehr gering, was ebenfalls mit den Ergebnissen der qRT-PCR

übereinstimmt. Die höchste Expression in der Leber wurde mittels RNA-Mapping bei EcaMb4b ermittelt. Zusammen mit EcaMb1 stimmt dies ebenfalls mit der Expressionsanalyse aus der qRT-PCR überein. In dem Gemisch aus Kiemen, Gehirn, Leber und Ovarien zeigen überraschenderweise EcaMb4b und EcaMb4a die höchsten Expressionswerte auf. Möglicherweise können diese Expressionswerte auf eine sehr starke Expression in den Ovarien zurückzuführen sein. Im Rahmen der qRT-PCR-Analyse wurde die Genexpression der multiplen EcaMb-Gene in Gonaden untersucht, wobei keine genaue Differenzierung zwischen Ovarien und Testis vorgenommen wurde. Die sehr geringen Expressionswerte von EcaMb1 und EcaMb2b stimmen nicht mit der Ergebnissen der qRT-PCR überein.

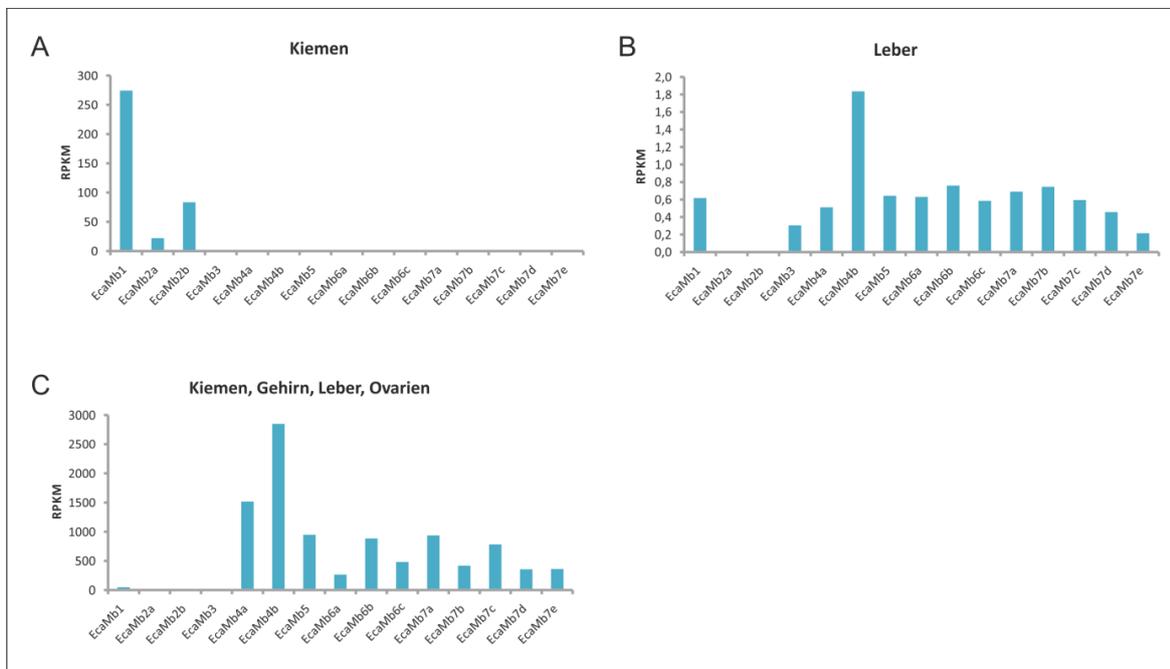


Abbildung 50 Genexpressionsanalyse der multiplen Mb-Gene im Flösselaal mittels RNA-Mapping

Dargestellt ist die Genexpression der multiplen Mb-Gene des Senegal-Flösselhechts in (A) den Kiemen, (B) der Leber und in einem Gemisch aus Kiemen, Gehirn, Leber und Ovarien (C). Die Stärke der Expression ist in Form des RPKM-Wertes (*Reads per kilobase of exon model per million mapped Reads*) angegeben. Das Mapping wurde mit der CLC-Workbench durchgeführt und die Reads mussten mit 95 % ihrer Länge und ihrer Sequenz mit der Referenzsequenz übereinstimmen.

4 Diskussion

Die Entstehung von neuen Genen durch Gen- oder Genomduplikationen ermöglicht die Entwicklung von neuen oder spezialisierten Funktionen im Tierreich. Dies führte zu einer erheblichen Artenvielfalt und ermöglichte eine optimale Anpassung an unterschiedlichste Habitate. Die Vervielfältigung von Genen wird dadurch zur treibenden Kraft der Evolution und zum Ursprung von evolutionären Neuheiten (Ohno 1970; Wolfe und Li 2003; Gu et al. 2003; Pichersky und Gang 2000; Ober 2005; Roth et al. 2007). Durch Gen- und Genomduplikation sind im Laufe der Evolution ganze Proteinfamilien entstanden, deren Mitglieder zumeist Funktionen aus einem gemeinsamen, übergeordneten Funktionsfeld übernehmen, ihre Funktionen innerhalb dieses Funktionsfeldes jedoch spezialisiert haben (z.B.: Hitzeschockproteine oder olfaktorische Rezeptorproteine). Eine der bekanntesten Proteinfamilien der Vertebraten bilden die Globine, von denen zurzeit acht Vertreter bekannt sind: Hämoglobin (Hb), Myoglobin (Mb), Neuroglobin (Ngb), Cytoglobin (Cygb), Globin E (GbE), Globin X (GbX), Globin Y (GbY) und Androglobin (Adgb). Obwohl in den meisten Vertebraten jeweils nur eine *single copy* Sequenz der *non-blood* Globine vorliegt, konnten in einigen Fischen multiple Globin-Sequenzen beschrieben werden.

Um ein besseres Verständnis der Entstehung und der funktionellen Entwicklungen von multiplen Globin-Genen zu erlangen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die duplizierten *Cygb*-Gene (*Cygb1* & *Cygb2*) in echten Knochenfischen (Teleostei) sowie multiple Mb-Gene in Flösselhechtartigen (Polypteriformes) untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklung und vor allem die Funktionen von *Cygb1* und *Cygb2* zu untersuchen, wodurch Rückschlüsse auf ihr evolutionäres Schicksal (Neofunktionalisierung, Subfunktionalisierung, Subneofunktionalisierung, Pseudogenisierung, additiver Effekt) möglich sind. Die erzielten Ergebnisse werden in Hinblick auf diese Fragestellung unter den Punkten 4.1 - 4.2.5 diskutiert. Des Weiteren konnten im Rahmen dieser Arbeit 15 multiple Mb-Gene im Senegal-Flösselhecht (*Polypterus senegalus*) und im Flösselaal (*Erpetoichthys calabaricus*) beschrieben werden, zu denen phylogenetische Untersuchungen und Expressionsanalysen durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse sollen ebenfalls erste Hinweise auf das evolutionäre Schicksal der multiplen Mb-Gene liefern und sind in diesem Zusammenhang unter den Punkten 4.3 - 4.3.3 diskutiert.

4.1 Evolution der duplizierten *Cygb*-Gene in echten Knochenfischen (Teleostei)

Die duplizierten *Cygb*-Gene der Teleostei zählen zu den wenigen multiplen *non-blood* Globin-Genen und bieten sich daher für die Untersuchung von neuen oder spezialisierten Funktionen durch Gen- oder Genomduplikationen an. Neben den duplizierten *Cygb*-Genen konnten u.a. noch zwei paraloge *Ngb*-Gene in Lachsartigen (Gallagher und Macqueen 2017), fünf multiple *GbE*-Gene im Südamerikanischen Lungenfisch (*Lepidosiren paradoxa*) (Lüdemann et al. 2019), zwei *Mb*-Isoformen (*Mb1* und *Mb2*) im Karpfen (*Cyprinus carpio*) und dem Goldfisch (*Carassius auratus*) (Fraser et al. 2006; Roesner et al. 2008), drei *Mb*-Gene (*Mb α* , *Mb β* , *Mb γ*) im Silbergabelbart (*Osteoglossum bicirrhosum*) und im asiatischen Gabelbart (*Scleropages formosus*) (Gallagher und Macqueen 2017) und sieben *Mb*-Isoformen im Westafrikanischen Lungenfisch (*Protopterus annectens*) (Koch et al. 2016) beschrieben werden. Interessanterweise kam es in unterschiedlichen Fischarten zur konvergenten Entstehung von multiplen *Mb*-Genen (siehe 4.3.1, 4.3.2). Die duplizierten *Cygb*-Gene sind hingegen durch eine spezifische WGD (Fuchs et al. 2005) entstanden, die nach der Abspaltung der Holostei und der Teleostei von den Neopterygii ausschließlich in den Teleostei stattfand (tsWGD). Mit Ausnahme von Elopomorpha und nahezu allen Osteoglossiformes, die die basalen Ordnungen der Teleostei bilden, konnten sich die duplizierten *Cygb*-Gene in allen Teleostei manifestieren. In den Elopomorpha und in nahezu allen Osteoglossiformes ist im Laufe der Evolution eines der duplizierten *Cygb*-Gene verloren gegangen. Um ein besseres Verständnis der Entwicklung und der dauerhaften Fixierung der duplizierten *Cygb*-Gene zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit, Sequenzanalysen, phylogenetische Untersuchungen und Expressionsanalysen der duplizierten *Cygb*-Gene in diversen Teleostei durchgeführt (1.6, A, I).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die *single copy* *Cygb*-Gene der Tetrapoden und die duplizierten *Cygb*-Gene der Teleostei jeweils ein Monophylum bilden (Fuchs et al. 2005). Durch eine erheblich höhere Anzahl an verwendeten *Cygb1*- und *Cygb2*-Sequenzen konnten die hier durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen zeigen, dass die duplizierten *Cygb*-Gene ebenfalls monophyletisch sind (Abb. 15). Das deutet darauf hin, dass die duplizierten *Cygb*-Gene im Laufe der Evolution stark divergierten und sich klar voneinander abgrenzen. Wie bereits in einer vorherigen Studie beschrieben, veränderten sich die *Cygb1*-Sequenzen mit einer Substitutionsrate von 0.84×10^{-9} (Aminosäuresubstitutionen pro Stelle pro Jahr) signifikant schneller als die *Cygb2*-Sequenzen (0.61×10^{-9}). Beide duplizierten Gene evolvierten schneller als

das Säugetier-Cygb, welches eine Substitutionsrate von 0.3×10^{-9} aufweist (Fuchs et al. 2005). Eine höhere Substitutionsrate von *Cygb1* konnte mit den hier durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen bestätigt werden. Besonders hohe Substitutionsraten zeigen hierbei die *Cygb1*-Sequenzen des Zebrafisches und des Weißstirn-Messerfisches, was darauf hindeutet, dass sich diese Gene im Laufe der Evolution besonders schnell veränderten. Ähnlich schnelle Substitutionsraten konnten auch bei anderen multiplen Globin-Genen beschrieben werden. Die multiplen Mb-Gene des Westafrikanischen Lungenfisches evolvierten $\sim 2,2$ -mal schneller als die Mb-Gene der Tetrapoden und $\sim 4,5$ -mal schneller als die der Teleostei (Koch et al. 2016). Die zwei Mb-Isoformen im Karpfen (*Cyprinus carpio*) und im Goldfisch (*Carassius auratus*) weisen zahlreiche nicht konservative Aminosäuresubstitutionen auf, die so in keinem anderen *single copy* Mb-Gen vorkommen (Helbo et al. 2012). Vermutlich kommt es bei den multiplen Globin-Genen zu erhöhten Substitutionsraten und zahlreichen nicht konservativen Aminosäuresubstitutionen, da der Selektionsdruck nachlässt oder sich verändert, nachdem eine funktionelle Differenzierung und gewebespezifische Expression der duplizierten Gene stattgefunden hat (Helbo et al. 2012). Die Sequenzanalysen der duplizierten Cygb-Gene stehen mit den phylogenetischen Untersuchungen im Einklang. Die Analyse ergab ebenfalls, dass sich die *Cygb1*-Sequenzen im Vergleich zu den *Cygb2*-Sequenzen stärker veränderten (*Cygb1*-Sequenzen sind im Durchschnitt zu 57 % identisch, *Cygb2*-Sequenzen sind im Durchschnitt zu 85 % identisch). Die *Cygb2*-Sequenzen stimmen zu 55 % mit der Vorläufer *single copy* Cygb-Sequenz der Australischen Pflughnasenchimäre (*Callorhinchus milii*) überein, wohingegen die *Cygb1*-Sequenzen nur 46 % Übereinstimmung zeigen. Das deutet, ähnlich wie die phylogenetischen Untersuchungen, darauf hin, dass sich die *Cygb1*-Sequenzen im Laufe der Evolution stärker verändert haben und die *Cygb2*-Sequenzen im Vergleich dazu konserviert sind.

Die Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass *Cygb2* ein sehr konserviertes Expressionsmuster aufzeigt und in allen untersuchten Teleostei am stärksten im Gehirn exprimiert wird. *Cygb1* zeigt ein sehr diverses Expressionsmuster, was sich, abhängig vom Fisch und dem jeweiligen Gewebe, verändert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Cygb1* eher eine ubiquitäre Expression aufzeigt, wohingegen *Cygb2* verstärkt im Gehirn exprimiert wird (Fuchs et al. 2005; Corti et al. 2016a; Gallagher und Macqueen 2017). Die hier durchgeführten Expressionsanalysen beinhalten die größte bisher untersuchte Fisch-Diversität. Neben der ubiquitären Expression von *Cygb1* und der konservierten Expression von *Cygb2* zeigen die hier

erzielten Ergebnisse auf, dass sich die Expression von *Cygb1* in jeder einzelnen Fischart spezialisiert hat. Das deutet eventuell darauf hin, dass die Funktion von *Cygb1* nicht konserviert ist und sich zwischen den einzelnen Fischarten unterscheidet. Es wäre aber auch möglich, dass die Funktion von *Cygb1* konserviert ist und *Cygb1* möglicherweise in allen Teleostei als Sauerstoffversorgerprotein fungiert. Die unterschiedlichen Genexpressionsmuster von *Cygb1* wären in diesem Zusammenhang auf eine spezifische Anpassung an den O₂-Bedarf in den jeweiligen Fischarten in den unterschiedlichen Geweben zurückzuführen.

Während in den meisten Teleostei zwei duplizierte *Cygb*-Gene vorliegen, kam es in Lachsartigen (Salmonidae) durch eine weitere WGD (*salmonid-specific* WGD, ssWGD) (Macqueen und Johnston 2014; Lien et al. 2016) zur Entstehung von vier *Cygb*-Genen (*Cygb1a*, *Cygb1b*, *Cygb2a*, *Cygb2b*). Die hier durchgeführten Genexpressionsanalysen in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und im Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) (Abb. 17) haben gezeigt, dass die multiplen *Cygb*-Gene in Lachsartigen sehr gering exprimiert werden. Interessanterweise werden alle *Cygb*-Gene in der Regenbogenforelle und im Atlantischen Lachs im Gehirn exprimiert, was darauf hindeuten könnte, dass die multiplen *Cygb*-Gene einen additiven Effekt ausüben. Es wurde bereits postuliert, dass die multiplen Mb-Gene vom Westafrikanischen Lungenfisch einen additiven Effekt in Hinblick auf die Sauerstoffversorgung ausüben könnten. Aufgrund der hohen Divergenzen der Aminosäuresequenzen und durch unterschiedliche Genexpressionsmuster ist es aber wahrscheinlicher, dass die multiplen PanMb-Gene verschiedene Funktionen ausüben (Koch et al. 2016). Die multiplen GbE-Gene des Südamerikanischen Lungenfisches weisen sehr ähnliche Sequenzen auf und haben alle ihr Expressionsmaximum in den Ovarien. Dies lässt einen additiven Effekt der GbE-Gene im Südamerikanischen Lungenfisch vermuten (Lüdemann et al. 2019). Die *Cygb1*- und *Cygb2*-Sequenzen in der Regenbogenforelle und im Atlantischen Lachs weisen hohe Ähnlichkeiten auf (*Cygb1* - 89 %, *Cygb2* - 82 %), was für einen additiven Effekt sprechen könnte. Um einen möglichen additiven Effekt der multiplen *Cygb*-Gene der Lachsartigen genauer zu untersuchen, sollten u.a. biochemische Analysen (z.B.: Messung der Sauerstoffaffinität) durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu allen anderen Teleostei verfügen die Elopomorpha nur über ein *single copy* *Cygb*-Gen. Vermutlich wurde im Laufe der Evolution eines der duplizierten *Cygb*-Gene in den Elopomorpha eliminiert. Die hier durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen zeigen,

dass die Cygb-Gene der Elopomorpha ein Monophylum bilden und sich dadurch klar von den duplizierten Cygb-Genen der anderen Teleostei abgrenzen (Abb. 15). Die Elopomorpha sind basale Vertreter der Teleostei und ihre Cygb-Sequenzen ordnen sich auch in dem hier angefertigten Stammbaum in eine basale Position ein. Das *non blood* Globinrepertoire der Elopomorpha umfasst GbX, Ngb, Mb und eine *single copy* Cygb-Sequenz (Gallagher und Macqueen 2017). Nach der tsWGD kam es in den Elopomorpha vermutlich zu einem Verlust des duplizierten Cygb-Genes. Ein Verlust von Globin-Genen konnte bereits in anderen Arten beschrieben werden. Im Westafrikanischen Lungenfisch kam es zu einem Verlust von Ngb und Cygb (Koch et al. 2016), obwohl dies die am stärksten konservierten Globine sind (Burmester et al. 2004). Möglicherweise übernehmen die multiplen Mb-Gene hier die Funktionen der fehlenden Globine (Koch et al. 2016). Obwohl Ngb ein hochkonserviertes Protein ist, fehlt es außerdem im Neunauge (Schwarze et al. 2014) und in Knorpelfischen (Opazo et al. 2015). Ein Grund für den Verlust des hochkonservierten und ursprünglichen Ngbs konnte noch nicht ermittelt werden (Opazo et al. 2015; Schwarze et al. 2014). Im Dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus*), einigen Antarktischen (Notothenioidei), in Fröschen sowie in der Spitzmausbeutelratte (*Monodelphis domestica*) kam es zum Verlust des funktionellen Mb-Gens (Xi et al. 2007; Maeda und Fitch 1982; Sidell und O'Brien 2006; Hoffmann et al. 2011; Fuchs et al. 2006). Der Verlust von Mb (und auch Hb) in einigen Antarktischen scheint zu keinem physiologischen Vorteil zu führen, sondern führt vielmehr zu einer Abnahme der physiologischen Leistung der Fische (Sidell und O'Brien 2006). Der Verlust könnte demnach als eine „Disaptation“ gedeutet werden (Sidell und O'Brien 2006; Baum und Larson 1991; Montgomery und Clements 2000). Es ist aber wahrscheinlicher, dass die niedrigen Wassertemperaturen in der Antarktis Mb überflüssig machen, da das physikalisch gelöste O₂ im kalten Wasser ausreichen könnte, um die Eisfische, die eine geringe Atmungsrate aufzeigen, ausreichend mit O₂ zu versorgen. Das fehlende Mb in Fröschen wird vermutlich im Herzen durch Hb kompensiert (Maeda und Fitch 1982) und in Muskelzellen durch Cygb (Xi et al. 2007). Der Verlust des duplizierten Cygb-Gens in Elopomorpha könnte ähnlich wie im Westafrikanischen Lungenfisch und in Fröschen durch ein anderes Globin kompensiert werden. Außerdem wäre es möglich, dass das duplizierte Cygb-Gen der Elopomorpha im Laufe der Evolution eliminiert wurde, da es nicht benötigt wurde. Elopomorpha bilden (neben Osteoglossomorpha und Clupeocephala) eine der drei ursprünglichen Teleostei-Linien, wodurch genetische Abweichungen zu den anderen Teleostei wahrscheinlich sind (Gallagher und Macqueen 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die duplizierten *Cygb*-Gene im Laufe der Evolution schnell und stark divergierten. Die *Cygb1*-Sequenzen weisen im Vergleich zu den *Cygb2*-Sequenzen noch höhere Substitutionsraten auf und die Genexpression variiert abhängig von der jeweiligen Fischart und dem Gewebe. Dieses variable Genexpressionsmuster deutet entweder auf unterschiedliche Funktionen von *Cygb1* hin oder ist darauf zurückzuführen, dass *Cygb1* in allen Teleostei als Sauerstoffversorgerprotein fungiert und sich der Ort der Genexpression an die jeweiligen Umstände (z.B. physiologische Unterschiede oder abiotische Faktoren) angepasst hat. *Cygb2* zeigt ein konserviertes Genexpressionsmuster und eine langsamere Substitutionsrate, was auf eine beständige Funktion (z.B.: Beteiligung an Stoffwechselwegen in neuronalen Geweben) hindeutet.

4.2 Funktion der duplizierten *Cygb*-Gene während der Entwicklung des Zebrafisches

In einer vorherigen Studie konnte bereits ein erheblicher Anstieg der Genexpression von *Cygb1* ab ~31 hpf beschrieben werden, der auf eine mögliche Beteiligung an der Organogenese hindeutet (Tiedke et al. 2011). In diesem Zeitraum findet auch die Erythropoese statt. Da *Cygb1* auch in Blutgefäßen vorkommt, wurde postuliert, dass *Cygb1* vor allem in Blutzellen bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen als spezialisierter Sauerstoffträger fungieren könnte (Corti et al. 2016a). Um den Einfluss von *Cygb1* auf die Entwicklung von Zebrafisch-Embryonen genauer zu untersuchen, wurde die Lokalisation von *Cygb1* in Embryonen analysiert sowie das Wachstum von *Cygb1*-Knockoutmutanten im Vergleich zu *Cygb1*-Wildtypen dokumentiert. Die *whole mount in situ*-Hybridisierungen zeigen, dass *Cygb1* zu allen untersuchten Zeitpunkten der Entwicklung im Kopfbereich der Zebrafischembryonen lokalisiert ist. Darüber hinaus ist ein deutliches *Cygb1*-Signal in den sich entwickelnden Organen im 48 hpf alten Embryonen zu erkennen (Abb. 24, Abb. 25). Die Lokalisation lässt vermuten, dass *Cygb1* möglicherweise an der Entwicklung der Organe sowie an der Ausbildung der neuronalen Strukturen im Gehirn beteiligt ist. Eine Beteiligung an der Organogenese wurde bereits in einer vorherigen Studie postuliert (Tiedke et al. 2011). Um zu untersuchen, ob das Fehlen von *Cygb1* einen direkten Einfluss auf die Entwicklung von Zebrafischen nimmt, wurden verschiedene embryonale Wachstumsphasen vom *Cygb1*-Knockout dokumentiert (Abb. 38).

Die Embryonen der *Cygb1*-Knockoutmutanten weisen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (3 hpf, 9 hpf, 24 hpf, 32 hpf, 48 hpf und 72 hpf) Abnormalitäten auf. Möglicherweise wird das Fehlen von *Cygb1* in Zebrafisch-Embryonen soweit kompensiert, dass es zu keinen

Fehlbindungen kommt. Um einen kompensatorischen Effekt zu untersuchen, könnten Transkriptome der Embryonalstadien der *Cygb1*-Knockoutmutanten generiert und analysiert werden. Die normale Entwicklung der *Cygb1*-Knockoutmutanten könnte aber auch dafür sprechen, dass *Cygb1* zwar während der Wachstumsphase exprimiert wird, aber keine essentiellen Funktionen während der Entwicklung des Zebrafisches übernimmt.

Cygb2 zeigt, im Vergleich zu *Cygb1*, nur einen mäßigen Anstieg der Genexpression während der Zebrafisch-Entwicklung auf. Nach 120 hpf erreicht *Cygb2* jedoch die gleiche Expressionsstärke wie *Cygb1* (Tiedke et al. 2011). Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten *whole mount in situ*-Hybridisierungen zeigen allerdings auch bei 120 hpf ein recht schwaches Signal für *Cygb2* auf, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass eine *in situ*-Hybridisierung keine quantifizierende Methode ist, sondern nur Rückschlüsse auf die Lokalisation zulässt. *Cygb2* zeigt ab 72 hpf ein Signal im primordialen Kanal des Rhombencephalons, in der Anlage des Ohres und im Neurocoel. Die Lokalisation deutet darauf hin, dass *Cygb2* auch schon in Embryonen in neuronalen Strukturen vorkommt und hier vermutlich spezifische Funktionen übernimmt.

4.3 Funktionshypothesen zu den duplizierten *Cygb*-Genen im Zebrafisch (*Danio rerio*)

Die divergente Entwicklung und die unterschiedlichen Expressionsmuster (3.1.2–3.1.3) der duplizierten *Cygb*-Gene in Teleostei deuten darauf hin, dass *Cygb1* und *Cygb2* unterschiedliche Funktionen ausüben. Um die Funktionen von *Cygb1* und *Cygb2* im Zebrafisch genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Stressversuche durchgeführt (3.3). Darüber hinaus wurden Transkriptomanalysen von *Cygb1*-Knockoutmutanten untersucht und analysiert (3.4). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass *Cygb1* und *Cygb2* im Laufe der Evolution unterschiedliche Funktionen entwickelt haben, aber möglicherweise auch ähnliche Funktionen in unterschiedlichen Geweben ausüben. Eine genauere Analyse der putativen Funktionen von *Cygb1* und *Cygb2* sind im Folgenden aufgeführt (1.6, A, II).

4.3.1 *Cygb1* fungiert im Zebrafisch als Sauerstoffversorger- und antioxidatives Protein

Die Expression von *Cygb1* zeigt innerhalb der durchgeführten Stressversuche (3.3) die stärkste Regulation unter Sauerstoffmangelbedingungen (Hypoxie) auf (3.3.1). Hierbei wird die Genexpression von *Cygb1* in allen untersuchten Geweben hochreguliert, wobei die

Hochregulationen in den Kiemen, dem Gehirn und der Leber signifikant ist (Abb. 27). Die Stressmarkergene werden lediglich in den Kiemen und der Leber signifikant hochreguliert (Abb. 26), was darauf hindeuten könnte, dass *Cygb1* das Gehirn vor einem akuten Sauerstoffmangel schützt. Mb wird ebenfalls in allen untersuchten Geweben hochreguliert und zeigt somit ein ähnliches Regulationsmuster wie *Cygb1* auf. Die Funktionen von Mb als Sauerstoffspeicher und Sauerstofftransportprotein sind bereits gut beschrieben (Wittenberg und Wittenberg 1989; Wittenberg 2003), wodurch Mb im Rahmen dieses Stressversuches als Positiv-Kontrolle fungiert. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass *Cygb1* ähnlich wie Mb als Sauerstoffspeicher und Sauerstofftransportprotein wirkt, wobei *Cygb1* diese Funktionen vermutlich in anderen Zelltypen als Mb übernimmt. Die hier durchgeführten Lokalisationsuntersuchungen haben gezeigt, dass *Cygb1* im Gehirn in Neuronen und Blutgefäßen vorkommt und in der Leber in Hepatozyten lokalisiert ist (Abb. 19, 23). Des Weiteren konnten die hier durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigen, dass *Cygb1* in verschiedenen Neuronen-Typen vorkommt und verstärkt in Spinal-Neuronen exprimiert wird (Abb. 21). Vermutlich fungiert *Cygb1* in diesen Zelltypen als Sauerstoffversorgerprotein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Cygb1* Eigenschaften aufweist, die einem Sauerstofftransportprotein ähneln, wie etwa die Pentakoordination des Häm-Fe²⁺ im deoxygenierten Zustand und eine langsamere Autoxidationsrate. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine Funktion als Sauerstofftransportprotein für *Cygb1* postuliert (Corti et al. 2016a). Die Ergebnisse aus dem hier durchgeführten Hypoxie-Versuch bestätigen diese Annahme.

Der ROS-Stress (3.3.2) führt zu einer Hochregulation der Genexpression von *Cygb1* im Gehirn, dem Herzen und der Leber, wobei hier, im Gegensatz zum Hypoxie-Versuch, weit weniger Regulationen signifikant sind. Die Genexpression von *Cygb1* ist während des ROS-Stresses signifikant im Herzen hochreguliert. Die Stressmarkergene Hsp27 und die Katalase werden ebenfalls signifikant im Herzen hochreguliert, was die Entstehung von ROS bestätigt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass *Cygb1* gewebeabhängig an der Detoxifizierung von ROS beteiligt sein könnte. Eine antioxidative Wirkung konnte bereits für das Säugetier-Cygb gezeigt werden. Hierbei wurde die Involvierung von Cygb an der Detoxifizierung von ROS in myogenen Vorläuferzellen, Gliomzellen, Fibroblasten und Neuroblastomzellen beschrieben (Fang et al. 2011; Singh et al. 2014; Xu et al. 2006; Li et al. 2007b; Hodges et al. 2008). Obwohl bereits eine antioxidative Wirkung von Mb in der Maus beschrieben werden konnte (Flögel et al. 2004),

wird die Genexpression von Mb überraschenderweise in allen untersuchten Geweben runterreguliert. Die hier erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mb im Zebrafisch, im Gegensatz zu *Cygb1*, nicht an der Detoxifizierung von ROS beteiligt ist.

4.3.2 Transkriptomanalysen der *Cygb1*-Knockoutmutanten

Um die Funktionen von *Cygb1* genauer zu untersuchen, wurden *Cygb1*-Knockoutmutanten generiert, deren Leber- und Gehirn-Transkriptome mit Wildtyp-Transkriptomen verglichen wurden. Da die durchgeführten Stressversuche und bereits publizierte Daten (Corti et al. 2016a) auf eine Sauerstoffversorger-Funktion für *Cygb1* hindeuten, wurden neben den Normoxie-Transkriptomen auch Hypoxie-Transkriptome generiert und analysiert. Kompensatorische Effekte (4.3.2.1, 4.3.2.2) und mögliche Funktionen (4.3.2.3, 4.3.2.4), die sich aus den Transkriptomanalysen ableiten lassen, sind in den folgenden Punkten diskutiert (1.6, A III). Die Funktionen der regulierten Gene wurden mittels ZFIN³⁴ (*The Zebrafish Information Network*) ermittelt.

4.3.2.1 Der *Cygb1*-Knockout wird im Gehirn durch mehr Hämoglobin und eine verstärkte Vaskularisierung kompensiert

Obwohl der *Cygb1*-Knockout auf ähnliche Funktionen von *Cygb1* im Gehirn und in der Leber hindeutet (4.3.2.3), wurden dennoch unterschiedliche kompensatorische Effekte in den beiden Geweben beobachtet. Im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante kommt es zu einer verstärkten Expression von Genen, dessen Genprodukte an der Angiogenese und an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sind (*Igals2b fold change* 64,57, FDR p-value 1,51E-6, *ace2 fold change* 63,70, FDR p-value 1,01E-4, *mep1a.2 fold change* 48,32, FDR p-value 0,02), sowie zur Hochregulation von Hämoglobin. Hämoglobin könnte in der *Cygb1*-Knockoutmutante, in dem gut vaskularisierten Gehirn, partiell die Aufgaben von *Cygb1* übernehmen. Ein kompensatorischer Effekt von Hämoglobin wäre möglich, da *Cygb1* ebenfalls in Blutgefäßen lokalisiert ist (Abb. 19) (Corti et al. 2016a). Ähnlich wie im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante konnte im Herzen einer Myoglobin-Knockoutmutante eine erhöhte Hämoglobin-Konzentration sowie ein Anstieg des Blutflusses und der Kapillardichte beschrieben werden (Gödecke et al. 1999). Sowohl im Herzen der Myoglobin-Knockoutmutante als auch im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante deuten die kompensatorischen Mechanismen darauf hin, dass die O₂-Versorgung durch Hämoglobin

³⁴ <https://zfin.org/> (19.06.2019)

übernommen wird und die Diffusionswege von O₂, aus der Blutbahn in die Zellen, durch eine verstärkte Vaskularisierung verringert werden. Die kompensatorischen Effekte legen die Vermutung nahe, dass sowohl Myoglobin im Herzen als auch *Cygb1* im Gehirn eine wichtige Rolle in der O₂-Versorgung spielen. Kinetische Untersuchungen deuteten bereits darauf hin, dass *Cygb1* vermutlich als Sauerstoffversorgerprotein fungiert (Corti et al. 2016a).

4.3.2.2 Der *Cygb1*-Knockout wird in der Leber durch Cytochrom P450 Proteine kompensiert

Die statistische Analyse zeigt für die Leber der *Cygb1*-Knockoutmutante unter Normoxie-Bedingungen im Vergleich zum *Cygb1*-Wildtypen sechs verschiedene, regulierte Gengruppen auf (Abb. 40, B). Vier dieser Gengruppen beinhalten ausschließlich Gene, die für Cytochrom P450 Proteine kodieren (*oxidoreductase activity*, *iron ion binding*, *heme binding*, *steroid hydrolase activity*). Einige dieser Cytochrom P450 Proteine sind unter den Top 10 der hochregulierten Gene in der Leber der *Cygb1*-Knockoutmutante vertreten und weisen einen *fold change* von 344 bis 1.358 auf. Somit zählen die Cytochrom P450 Proteine u.a. zu den am stärksten regulierten Genen und den größten hochregulierten Gengruppen in der Leber. Cytochrom P450 Proteine bilden eine der größten Superfamilien von Enzymen und sind in allen bisher untersuchten Organismen vorhanden. Ihre Aminosäure-Sequenzen weisen teilweise erhebliche Unterschiede auf (bis zu 84 %), wobei ihre Tertiärstruktur extrem konserviert ist (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000). Obwohl die Cytochrom P450 Proteine in vielen Organen vorkommen, weisen sie besonders hohe Konzentrationen in der Leber auf (Villeneuve und Pichette 2004). In Eukaryoten sind die Cytochrom P450 Proteine oftmals am endoplasmatischen Retikulum oder in der inneren mitochondrialen Membran verankert. Cytochrom P450 Proteine sind Häm-Proteine mit katalytischen Eigenschaften. Sie fungieren als Oxidoreduktasen und hydroxylieren körpereigene und körperfremde Kohlenwasserstoff-Verbindungen. Diese Hydroxylierung spielt eine wesentliche Rolle bei der Wirkung verschiedener Arzneimittel (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000). Die Cytochrom P450 Proteine könnten möglicherweise als Häm-Proteine, mit Fe²⁺-Ion als Zentralatom, partiell Aufgaben von *Cygb1* übernehmen. Hierbei könnten die Cytochrom P450 Proteine u.a. als Oxidoreduktasen fungieren und an Redoxreaktionen beteiligt sein, bei denen möglicherweise das am Cytochrom P450 gebundene O₂ als Elektronenakzeptor dient. Da anscheinend die Cytochrom P450 Proteine das Fehlen von *Cygb1* kompensieren,

würde somit normalerweise *Cygb1* als Oxidoreduktase fungieren und könnte möglicherweise an der Detoxifizierung von ROS beteiligt sein.

4.3.2.3 Der *Cygb1*-Knockout führt in beiden Geweben zu einer Umstellung des Lipid-Stoffwechsels und der Ion-Homöostase sowie zur Runterregulation von *Nos2a*

Obwohl die kompensatorischen Effekte im *Cygb1*-Knockout gewebespezifisch sind (4.3.2.1, 4.3.2.2), konnten funktionelle Gemeinsamkeiten von *Cygb1* in der Leber und im Gehirn ermittelt werden. Unter Normoxie-Bedingungen wird u.a. die *inducible nitric oxide synthase 2a* (*Nos2a*) in beiden Geweben runterreguliert und könnte somit einen möglichen Interaktionspartner von *Cygb1* darstellen (Abb. 51 D).

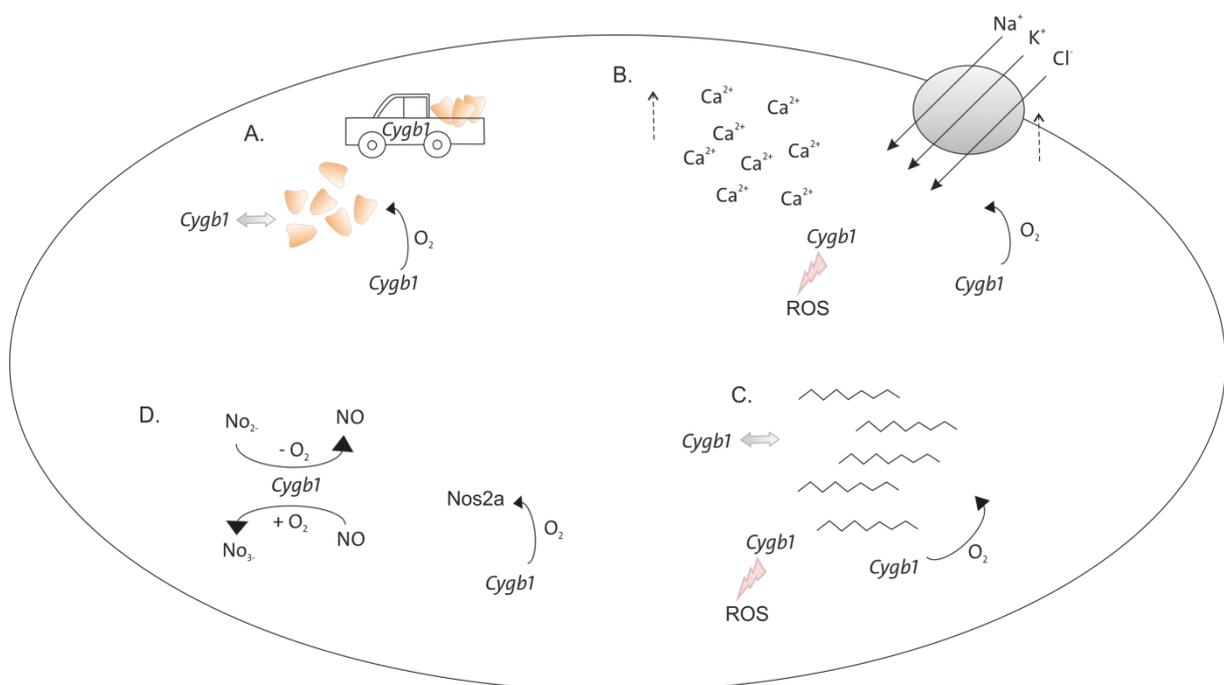


Abbildung 51 Übersicht der möglichen Funktionen von *Cygb1*

Dargestellt sind putative Funktionen von *Cygb1*, die aus den Transkriptomanalysen der *Cygb1*-Knockoutmutante abgeleitet wurden. **A.** *Cygb1* könnte möglicherweise an der Synthese und/oder an dem Transport von Cholesterin beteiligt sein oder mit Cholesterin interagieren. **B.** Vermutlich ist *Cygb1* an der Detoxifizierung von ROS beteiligt und fungiert als Sauerstofftransportprotein. Schwankende Sauerstoff-Konzentrationen und ROS-Konzentrationen haben wiederum Einfluss auf die Ion-Homöostase einer Zelle. Das Fehlen von *Cygb1* führt vermutlich zu einer erhöhten ROS-Konzentration und zu einem O₂-Mangel, was zu einer verstärkten Aktivität von Na-K-2Cl-Cotransportern und Calcium bindenden Proteinen führt. **C.** Möglicherweise stellt *Cygb1* auch O₂ für die Synthese von Lipiden und Fettsäuren zur Verfügung und/oder schützt Lipide und Fettsäuren vor ROS. Es wäre auch möglich, dass *Cygb1* mit Lipiden und Fettsäuren interagiert. **D.** *Cygb1* ist möglicherweise an dem NO-Metabolismus beteiligt und könnte bei

niedrigem O₂-Partialdruck als Nitritreduktase und bei hohem O₂-Partialdruck als Nitrit-Dioxygenase fungieren. Möglich wäre auch, dass *Cygb1* O₂ für die NO-Synthese bereitstellt.

Nos2a synthetisiert Stickstoffmonoxid (NO), welches ein wichtiges Signalmolekül in der Vasodilatation, in der Neurotransmission, in der Langzeitpotenzierung, im Verhalten, in der Knochenbildung sowie in der Immunantwort ist (Gödecke und Schrader 2000). Es konnte bereits gezeigt werden, dass rekombinant exprimiertes *Cygb1* des Zebrafisches eine sehr hohe Nitritreduktase-Aktivität aufweist (Corti et al. 2016a). Außerdem konnte bereits eine Kollokalisierung vom Säugetier-Cygb und Nos in Neuronen beschrieben werden (Avivi et al. 2010, Hundahl et al. 2013), die eine Involvierung von Cygb in den NO-Metabolismus vermuten lässt (Burmester und Hankeln 2014). Hierbei kann Cygb, abhängig von der vorliegenden O₂-Konzentration (Liu et al. 2012; Burmester und Hankeln 2014), sowohl als Nitrit-Dioxygenase (Halligan et al. 2009) als auch als Nitritreduktase (Petersen et al. 2008; Alzawahra et al. 2008) fungieren. In *Cygb*-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass *Cygb* in der glatten Muskulatur von Blutgefäßen als Nitrit-Dioxygenase eine essentielle Rolle im NO-Metabolismus spielt. Hierbei ist *Cygb* maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks und an der Vasokonstriktion beteiligt (Liu et al. 2017). Die hier ermittelten Ergebnisse lassen, ähnlich wie im Säugetier-Cygb, eine Beteiligung von *Cygb1* an dem NO-Metabolismus vermuten (Abb. 51 D).

Des Weiteren findet unter Normoxie-Bedingungen in beiden Geweben eine Umstellung des Cholesterin-Stoffwechsels statt (Abb. 51 A). Hierbei werden in der Leber Gene, dessen Genprodukte an der Cholesterin-Biosynthese beteiligt sind, signifikant runterreguliert (*fold enrichment* 80.71, FDR *p*-value 1,52E-02) und im Gehirn Cholesterin bindende Proteine hochreguliert. Es wäre möglich, dass *Cygb1* (a) O₂ für die Cholesterin-Biosynthese bereitstellt, (b) mit Cholesterin interagiert oder (c) an dem Transport von Cholesterin beteiligt ist. (a) Wenn *Cygb1* O₂ für die Cholesterin-Biosynthese bereitstellt, könnte die fehlende Bereitstellung von O₂ in der *Cygb1*-Knockoutmutante eine Runterregulation der Cholesterin-Biosynthese in der Leber erklären. Im Gehirn wird hingegen die Cholesterin-Biosynthese nicht runterreguliert. Möglich wäre, dass das hochregulierte Hämoglobin das benötigten O₂ im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante bereitstellt und daher die Cholesterin-Biosynthese nicht runterreguliert werden muss. Das würde jedoch nicht erklären, warum Cholesterin bindende Proteine im Gehirn hochreguliert werden, was wiederum gegen die Bereitstellung von O₂ durch *Cygb1* für die Cholesterin-Biosynthese spricht. (b) Es ist auch möglich, dass *Cygb1* in der Lage ist,

Cholesterin zu binden und damit zu interagieren. Eine Interaktion zwischen Cholesterin und Globinen wurde in vorherigen Studien beschrieben (Morrill und Kostellow 2016; Nikolić et al. 2004; Datta et al. 2008; Zhao et al. 2008). Morrill et al. beschrieben hierbei die Interaktion zwischen Cholesterin und Globinen (Cygb, Ngb, Mb und die Untereinheit β von Hb), die zu einer Strukturveränderung der Globine führt, welche die Aufnahme und Abgabe von Liganden positiv beeinflusst. Die Runterregulation der Cholesterin-Biosynthese in der Leber könnte auf eine Interaktion von *Cygb1* und Cholesterin hindeuten. Die Hochregulation von Cholesterin bindenden Proteinen im Gehirn spricht eher gegen eine funktionelle Interaktion von *Cygb1* und Cholesterin. (c) Da Cholesterin nicht wasserlöslich ist, benötigt es Transportproteine, die es über die Blutbahn zum Zielort transportieren. Die bekanntesten Transportproteine sind Lipoproteine, die aus Fett und Eiweiß bestehen (Kwiterovich Jr 2000). Im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante werden die Lipoproteine *apoea* (*fold change* 62,73, FDR p-value 1,75E-5), *apoa4b.2* (*fold change* 56,19, FDR p-value 5,65E-5), *apoa1a* (*fold change* 23,65, FDR p-value 2,92E-6), *apoa4b.1* (*fold change* 8,82, FDR p-value 0,01), *apoc2* (*fold change* 6,57, FDR p-value 0,03) und *afp4* (*fold change* 6,09, FDR p-value 0,02) hochreguliert. Obwohl in der Leber die Cholesterin-Biosynthese runterreguliert wird, werden dennoch zwei Cholesterin bindende Proteine hochreguliert (*star fold change* 32,60, FDR p-value 3,69E-4, *apoda* *fold change* 12,56, FDR p-value 7.34E-4). Die Runterregulation der Cholesterin-Biosynthese und die Hochregulation von Cholesterin bindenden Proteinen lassen vermuten, dass *Cygb1* als Cholesterin-Transportprotein fungiert. Es wurde bereits in einer vorherigen Studie beschrieben, dass Hämoglobin Cholesterin mit einer hohen Affinität bindet und somit eine neue Form der Cholesterin-Zirkulation in der Blutbahn darstellen könnte (Nikolić et al. 2004). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Cygb1* ebenfalls an dem Transport von Cholesterin beteiligt sein könnte. Ebenfalls für eine Involvierung von *Cygb1* in den Transport von Cholesterin spricht die Lokalisation von *Cygb1* in Blutgefäßen (Abb. 19) (Corti et al. 2016a). Darüber hinaus ist der Hauptsyntheseort von Cholesterin die Leber, die auch den Hauptexpressionsort von *Cygb1* darstellt. Auch das Gehirn synthetisiert Cholesterin, da Cholesterin nicht die Bluthirnschranke passieren kann (Björkhem und Meaney 2004). Um eine mögliche Funktion von *Cygb1* als Cholesterin-Transportprotein zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Neben der Umstellung des Cholesterin-Stoffwechsels konnte im *Cygb1*-Knockout unter Normoxie-Bedingungen eine Regulation von weiteren Lipid bindenden Proteinen beobachtet werden. Im Gehirn findet eine Hochregulation der Fettsäure bindenden Proteine *fabp1b.1* (*fold*

change 59,30, FDR p-value 9,01E-5) und *fabp2* (*fold change* 4,94, FDR p-value 0,03) statt. In der Leber wird das Fettsäure bindende Protein *fabp6* (*fold change* 21,21, FDR p-value 0,01) hochreguliert, wohingegen die Phospholipid bindenden Proteine *zgc:173443* (*fold change* -760,83, FDR p-value 3,68E-6) und *zgc:158494* (*fold change* -318,37, FDR p-value 2,99E-6) zu den drei am stärksten runterregulierten Genen in der *Cygb1*-Knockout-Leber zählen. Diese Regulation lässt vermuten, dass *Cygb1*, ähnlich wie bei Cholesterin, an der Biosynthese der Lipide beteiligt ist, die Lipide schützt oder mit ihnen interagiert. Eine Beteiligung von Globinen am Lipid-Metabolismus wurde bereits postuliert (Burmester und Hankeln 2014). Das *single copy* *Cygb* von Säugern ist in der Lage, Lipide zu binden (Corti et al. 2016a; Reeder et al. 2011; Beckerson et al. 2015). Obwohl die vorliegenden Ergebnisse eine Interaktion von *Cygb1* und Lipiden vermuten lassen, wurde in einer vorherigen Studie eine niedrige Lipid-Affinität für die *Cygb1* beschrieben (Corti et al. 2016a). Möglicherweise haben die Versuchsbedingungen (rekombinant exprimiertes Protein im Vergleich zur Interaktion im Zellverbund) und die Lipid-Art (Ölsäure im Vergleich zu Fettsäure oder Phospholipiden) einen erheblichen Einfluss auf die Resultate. Myoglobin bindet Lipide mit einer geringen Affinität, wohingegen Bakterienglobine Lipidbindungen mit einer sehr hohen Affinität ausbilden (Sriram et al. 2008; Bonamore et al. 2003). Obwohl die physiologische Relevanz der Globin-Lipid-Bindungen weitestgehend spekulativ ist, wird vermutet, dass die Membranassoziation ein evolutionär altes Merkmal der Globine ist und möglicherweise zum Schutz der Zellmembran beiträgt und hierbei die Lipide vor ROS schützt (Blank und Burmester 2012). Die erhebliche Runterregulation von Lipid bindenden Proteinen in der Leber legt die Vermutung nahe, dass *Cygb1* O₂ für die Lipid-Synthese bereitstellt. Um ein besseres Verständnis des Zusammenspiels von *Cygb1* und Lipiden und Fettsäuren zu erhalten, sollten weitere Untersuchungen angestellt werden.

Unter Normoxie-Bedingungen findet im Gehirn und in der Leber der *Cygb1*-Knockoutmutante des Weiteren eine Umstellung der Ion-Homöostase statt. Der *statistical overrepresentation test* zeigt in der Leber eine signifikante Zunahme der Expression von Genen, dessen Genprodukte als Na-K-2Cl-Cotransporter fungieren (*fold enrichment* > 100, FDR p-value 1,62E-02). Hierzu zählen *slc12a3* (*fold change* 2.212,49, FDR p-value 0,01), *slc12a1* (*fold change* 71,49, FDR p-value 3,28E-4), *slc6a18* (*fold change* 45,42, FDR p-value 0,02), *slc4a2a* (*fold change* 26,47, FDR p-value 2,64E-3) und *slco1f4* (*fold change* 42,64, FDR p-value 0,02). Des Weiteren werden in der Leber Gene hochreguliert, die an der Calcium-Homöostase beteiligt sind (*Irp2a* *fold change* 66,53, FDR p-value 7,09E-3; *pvalb3* *fold change* 26,80, FDR p-value 0,04; *pvalb1* *fold change* 21,99, FDR p-

value 1,34E-3, *fold change* 13,95, FDR p-value 0,02). Im Gehirn werden ein Gen aus der Transmembran-Transporter-Familie hochreguliert (*slco1f3 fold change* 12,02, FDR p-value 1,39E-4) und drei weitere Gene, dessen Genprodukte an der Calcium-Homöostase beteiligt sind (*S100a10a fold change* 64,98, FDR p-value 1,84E-5; *anxa2b fold change* 31,55, FDR p-value 0,03; *epdl2 fold change* 25,06, FDR p-value 7,34E-3). Möglicherweise ist der physiologische Zustand der Zellen durch den Verlust von *Cygb1* gestört und die Regulation der Transmembran-Transporterproteine und Calcium bindenden Proteine trägt zur Wiederherstellung der Ion- und Zell-Homöostase bei. Das Fehlen von *Cygb1* führt vermutlich zu einem Mangel an O₂ und möglicherweise zu einer Veränderung der ROS-Konzentration. Die daraus resultierenden Effekte sind wahrscheinlich verstärkt in der Leber zu beobachten, da im Gehirn das Fehlen von *Cygb1* durch eine Hochregulation von Hämoglobin und durch eine verstärkte Vaskularisierung kompensiert wird (4.3.2.1). Ein O₂-Mangel sowie die Änderung der ROS-Konzentration könnten einen direkten Einfluss auf die Regulation von Ion-assoziierten Genen haben (Gibson et al. 2008; Dai et al. 2005; Garvin und Ortiz 2003; Juncos und Garvin 2005; Wangenstein et al. 2006; Ortiz et al. 2018; Mungai et al. 2011; Waypa et al. 2002). Na-K-2Cl-Cotransporter sind elektronneutrale Transportproteine, welche etwa 70% - 80% des intrazellulären Natriums in die Zelle befördern. Der Co-Transport von Kalium und Calcium ist maßgeblich abhängig vom Natrium-Gradienten (Good et al. 1984). Ein Anstieg der Na-K-2Cl-Cotransporter-Aktivität und der Calcium-Konzentration wird durch einen O₂-Mangel und durch reaktive Sauerstoffspezies begünstigt. Hierbei scheint ROS als Signalgeber zu fungieren, wobei die Konzentration von ROS maßgeblich von der O₂-Konzentration abhängt (Gibson et al. 2008; Dai et al. 2005; Garvin und Ortiz 2003; Juncos und Garvin 2005; Mungai et al. 2011; Waypa et al. 2002). Der Anstieg von Na-K-2Cl-Cotransportern und Calcium bindenden Proteinen in der *Cygb1*-Knockoutmutante lässt vermuten, dass durch das Fehlen von *Cygb1* ein O₂-Mangel auftritt und eine erhöhte ROS-Konzentration vorliegt. Demzufolge würde *Cygb1* als Sauerstofftransportprotein fungieren und an der Detoxifizierung von ROS beteiligt sein.

4.3.2.4 Hypoxie-Antwort der *Cygb1*-Knockoutmutante im Vergleich zum *Cygb1*-Wildtyp

Im Gehirn des *Cygb1*-Wildtyps lässt sich eine klassische Hypoxie-Antwort beobachten. Hierbei werden O₂ bindende und transportierende Proteine mit einem *fold enrichment* von > 100 (FDR p-value 5,66E-06) hochreguliert. Zu diesen O₂ bindenden und transportierenden Proteinen

zählt u.a. Hämoglobin, welches signifikant mit einem *fold change* von 5,32 hochreguliert wird. In der Leber des *Cygb1*-Wildtypen ist das am stärksten hochregulierte Gen ein Cytochrom 450 Protein (*cyp2p9*, *fold change* 553,27, FDR p-value 2,25E-6). Darüber hinaus wird Myoglobin mit einem *fold change* von 3,14 hochreguliert (FDR p-value 0,51, p-value 5,87E-3). Die Anzahl der regulierten Gene im Gehirn der *Cygb1*-Knockoutmutante ist geringer als die im *Cygb1*-Wildtypen. Vermutlich findet unter Normoxie-Bedingungen schon eine Umstellung statt, die vor einer Hypoxie schützt. Hervorzuheben ist hier die Hochregulation von Hämoglobin und eine verstärkte Vaskularisierung (4.3.2.1). In der Leber der *Cygb1*-Knockoutmutante ist die Anzahl der regulierten Gene wesentlich höher als im *Cygb1*-Wildtypen. Die Leber ist der Hauptexpressionsort von *Cygb1*, was darauf hindeutet, dass die Funktionen von *Cygb1* in der Leber essentiell und unersetzlich sind. Die kompensatorischen Effekte unterscheiden sich zudem von denen im Gehirn. Dennoch werden unter Hypoxie-Bedingungen in der *Cygb1*-Knockoutmutante sieben gleiche Gene in der Leber und im Gehirn reguliert. Hierbei codieren die hochregulierten Gene ausschließlich für Vitellogenine, die als Vorläufer von Lipoproteinen und Phosphoproteinen produziert werden. In beiden Geweben werden darüber hinaus Lipid-Transportproteine signifikant hochreguliert (Leber KO - *fold enrichment* 24.59, FDR p-value 1,03E-05, Gehirn KO - *fold enrichment* > 100, FDR p-value 2,94E-09). Eine Hochregulation von Lipid-Transportproteinen findet unter Hypoxie-Bedingungen auch in den *Cygb1*-Wildtypen statt, wobei die Regulation in der *Cygb1*-Knockoutmutante höher ist (Leber WT - keine signifikante Regulation, Gehirn WT - *fold enrichment* > 36.13, FDR p-value 1.27E-04). Um möglichen Schäden an der Zellmembran unter Hypoxie vorzubeugen, könnten gezielt Lipide an entsprechende Stellen transportiert werden. Da die Regulation im *Cygb1*-Knockout höher ist, kommt es hier möglicherweise zu mehr Schäden an der Zellmembran. Diese könnten durch eine erhöhte Anzahl von ROS verursacht werden (Jambunathan 2010; Farmer und Mueller 2013; Leutner et al. 2001), die im *Cygb1*-Wildtypen vermutlich durch *Cygb1* detoxifiziert werden. Eine Beteiligung an der Entgiftung von ROS konnte bereits bei dem *single copy* *Cygb* nachgewiesen werden (Fang et al. 2011; Singh et al. 2014; Xu et al. 2006; Li et al. 2007b; Hodges et al. 2008). Interessanterweise werden im *Cygb1*-Knockout unter Hypoxie-Bedingungen Gene wieder runterreguliert, die unter Normoxie-Bedingungen zunächst hochreguliert wurden. Hierzu zählen in der Leber u.a. Gene, die für Na-K-2Cl-Cotransporter kodieren und im Gehirn Calcium, Lipid, Cholesterin und Fettsäure bindende Proteine. Möglicherweise erfordern diese kompensatorischen Regulationen zu viel Energie, um sie unter Hypoxie-Bedingungen aufrecht

zu erhalten. Unter den extremen Hypoxie-Bedingungen wird die verbleibende Energie vermutlich in die essentiellsten physiologischen Prozesse investiert.

4.3.3 Funktionsanalysen von *Cygb2* anhand der Stressversuche deuten auf antioxidative Funktionen hin

Die Genexpression von *Cygb2* zeigt innerhalb der durchgeführten Stressversuche (3.3) die stärkste Regulation unter ROS-Bedingungen auf (3.3.2). Hierbei wird die Genexpression von *Cygb2* in den Kiemen, dem Gehirn und dem Herzen hochreguliert, wobei die Zunahme der Expression im Gehirn und im Herzen signifikant ist. Die antioxidativen Stressmarkergene werden im Gehirn und teilweise auch im Herzen hochreguliert, wodurch die Entstehung von ROS in diesen Geweben bestätigt wird. Die Hochregulation von *Cygb2* deutet darauf hin, dass *Cygb2* an der Detoxifizierung von ROS beteiligt sein könnte. Das ebenfalls hexakoordinierte *single copy* *Cygb* von Säugetieren konnte bereits mit der Detoxifizierung von ROS in Verbindung gebracht werden (Fang et al. 2011; Singh et al. 2014; Xu et al. 2006; Li et al. 2007b; Hodges et al. 2008). Neben *Cygb2* wird auch *Cygb1* im Herzen unter ROS-Bedingungen signifikant hochreguliert. Möglicherweise sind beide duplizierten *Cygb*-Gene an der Detoxifizierung von ROS in diesem Gewebe beteiligt und üben hier einen additiven Effekt aus. Im Gehirn wird jedoch nur *Cygb2* signifikant hochreguliert. Die hier durchgeführten Lokalisationsuntersuchungen haben gezeigt, dass *Cygb2* im Gehirn, in dem es am stärksten exprimiert wird, in Neuronen lokalisiert ist (Abb. 20). Bereits in vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass *Cygb2* seinen Hauptexpressionsort in neuronalen Geweben hat (Fuchs et al. 2005; Corti et al. 2016a; Gallagher und Macqueen 2017). Die erhebliche Regulation von *Cygb2* unter ROS-Bedingungen im Gehirn deutet darauf hin, dass *Cygb2* als antioxidatives, neuroprotektives Protein fungiert.

Unter Hypoxie-Bedingungen wird *Cygb2*, neben *Cygb1*, in der Leber signifikant hochreguliert. Es wäre möglich, dass die duplizierten *Cygb*-Gene in diesem Gewebe beide eine Sauerstofftransport-Funktion übernehmen und einen additiven Effekt ausüben. Jedoch wird *Cygb1* in der Leber um ein Vielfaches stärker exprimiert als *Cygb2*. Außerdem weist *Cygb1*, im Gegensatz zu *Cygb2*, kinetische Eigenschaften auf, die einem Sauerstofftransportprotein ähneln (Corti et al. 2016a). Daher ist es wahrscheinlicher, dass die duplizierten *Cygb*-Gene in der Leber unter Hypoxie-Bedingungen keinen additiven Effekt ausüben, sondern vielmehr spezifische Aufgaben übernehmen. Möglicherweise fungiert *Cygb2* unter Sauerstoffmangel-

Bedingungen als Nitritreduktase und setzt NO₂- zu NO um. Nitritreduktase-Aktivitäten konnten schon für Myoglobin (Maus), Neuroglobin (Maus, Mensch), Hämoglobin (Ratte) und Cytoglobin (Maus) beschrieben werden (Brunori et al. 2005; Tiso et al. 2011; Hendgen-Cotta et al. 2008; Petersen et al. 2008; Alzawahra et al. 2008).

4.3.4 Die erzielten Ergebnisse deuten auf eine Subneofunktionalisierung von *Cygb1* und *Cygb2* hin

Nach der Entstehung duplizierter Gen-Kopien, durch Genom- oder Genduplikation, kann es zu unterschiedlichen Entwicklungen der duplizierten Gene kommen (Abb. 5, 1.6, A, I, a). Möglich sind eine Neofunktionalisierung, eine Subfunktionalisierung, eine Subneofunktionalisierung, eine Pseudogenisierung oder ein additiven Effekt (1.4.1). Die Arbeiten aus vorherigen Studien (Fuchs et al. 2005; Roesner et al. 2006; Corti et al. 2016a) deuten in Verbindung mit den hier erzielten Ergebnissen darauf hin, dass sich die duplizierten *Cygb*-Gene vermutlich subneofunktionalisiert haben. Eine Kombination aus (A) der evolutionären Entwicklung, (B) der Genexpression, (C) der Lokalisation, (D) den kinetischen Eigenschaften sowie (E) den Funktionen von *Cygb1* und *Cygb2* im Vergleich zu dem *single copy* *Cygb* deuten hierbei auf eine Subneofunktionalisierung hin.

(A) Die hohe Substitutionsrate und die starken Sequenzdivergenzen von *Cygb1* im Vergleich zu *Cygb2* und dem *single copy* *Cygb* (Fuchs et al. 2005) deuten darauf hin, dass, durch nachlassenden Selektionsdruck, eine funktionelle Differenzierung stattfinden konnte (Helbo et al. 2012). (B) Die hier erzielten Ergebnisse zeigen auf, dass sich das Genexpressionsmuster von *Cygb1* abhängig von der jeweiligen Fischart unterscheidet. *Cygb2* wird hingegen in allen untersuchten Fischarten am stärksten im Gehirn exprimiert (Abb. 16). Das *single copy* *Cygb* der Vertebraten wird nahezu in allen Geweben exprimiert (Burmester et al. 2002; Trent und Hargrove 2002), wobei sich die Expression auf einige spezifische Zelltypen beschränkt (Fibroblasten, fibroblasten-ähnliche Zellen, hepatische Sternzellen, Chondroblasten, Osteoblasten, einige Subpopulationen des zentralen und peripheren Nervensystems) (Nakatani et al. 2004; Schmidt et al. 2004; Hankeln et al. 2004). (C) Die zelluläre Lokalisation von *Cygb1* und *Cygb2* ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Lokalisationsuntersuchungen im Gehirn und in der Leber von Zebrafischen vorgenommen. Sowohl *Cygb1* als auch *Cygb2* sind in Neuronen des zentralen Nervensystems sowie in Hepatozyten lokalisiert. Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass

Cygb1 verstärkt in Spinal-Neuronen vorkommt und *Cygb2* in Intestinal-Neuronen (Abb. 21). Neben der Lokalisation in Neuronen und Hepatozyten konnte *Cygb1*, im Gegensatz zu *Cygb2*, immunhistochemisch in Blutgefäßen nachgewiesen werden (Abb. 19). Die Lokalisation in Neuronen und Hepatozyten haben die duplizierten *Cygb*-Gene mit dem *single copy* *Cygb* gemein. Eine Lokalisation in Blutgefäßen konnte nur für *Cygb1* nachgewiesen werden, was für die Entwicklung einer neuen Funktion spricht. (D) Vorherige Studien konnten bereits zeigen, dass *Cygb2* ähnliche kinetische Eigenschaften wie das *single copy* *Cygb* zeigt. Neben der Hexakoordinierung weisen *Cygb2* und das *single copy* *Cygb* u.a. langsamere Autoxidationsraten als *Cygb1* auf. *Cygb1* zeigt hingegen kinetische Eigenschaften eines Sauerstofftransportproteins (Corti et al. 2016a).

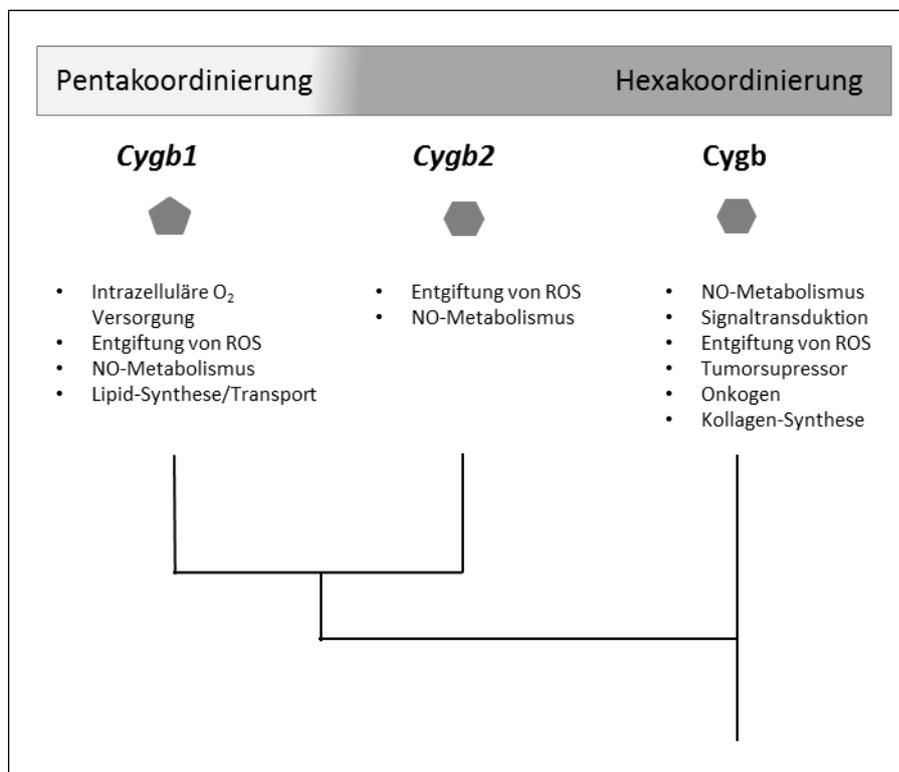


Abbildung 52 Übersicht zu den vermuteten Funktionen von *Cygb1*, *Cygb2* und dem *single copy* *Cygb*

Dargestellt sind die Funktionen von *Cygb1* und *Cygb2*, die sich aus den durchgeführten Stressversuchen und Transkriptomanalysen ableiten lassen. Die Funktionen für das *single copy* *Cygb* wurde aus bereits publizierten Studien zusammengetragen (Avivi et al. 2010; Hankeln et al. 2005; Schmidt et al. 2004; Schmidt et al. 2005; Hundahl et al. 2013; Reeder et al. 2011; Fang et al. 2011; Singh et al. 2014; Xu et al. 2006; Li et al. 2007b; Hodges et al. 2008; Oleksiewicz et al. 2011; Oleksiewicz et al. 2013; Shivapurkar et al. 2008; Thuy Le et al. 2016a; Burmester und Hankeln 2014).

(E) Eine Funktion als Sauerstoffversorgerprotein konnte für *Cygb1* in dieser Arbeit experimentell bestätigt werden (4.3.1, 4.3.2.3). Im Gegensatz dazu scheint eine Involvierung vom *single copy* *Cygb* in den Sauerstofftransport nahezu ausgeschlossen, da keine Korrelation zwischen der *Cygb*-Expression und dem Sauerstoffverbrauch besteht (Hankeln et al. 2005; Schmidt et al. 2005). Die hier durchgeführten Stressversuche legen die Vermutung nahe, dass *Cygb2* an der Entgiftung von ROS und am NO-Metabolismus beteiligt ist. Die Transkriptomanalysen der *Cygb1*-Knockoutmutanten deuten darauf hin, dass auch *Cygb1* an der Detoxifizierung von ROS beteiligt ist und im NO-Metabolismus eine Rolle spielt. Auch für das *single copy* *Cygb* konnten diese Funktionen bereits beschrieben werden (Avivi et al. 2010; Hundahl et al. 2013; Burmester und Hankeln 2014; Fang et al. 2011; Singh et al. 2014; Xu et al. 2006; Li et al. 2007b; Hodges et al. 2008). Die Funktionsanalysen der verschiedenen *Cygb*-Gene zeigen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. Die Gemeinsamkeiten deuten darauf hin, dass *Cygb1* und *Cygb2* möglicherweise ursprüngliche Funktionen beibehalten haben und diese Funktionen weiterhin in unterschiedlichen Zelltypen ausüben. Die Lokalisation in Blutgefäßen und die Funktion als Sauerstofftransportprotein konnte ausschließlich für *Cygb1* nachgewiesen werden. In Kombination mit der erhöhten Substitutionsrate und den starken Sequenzdivergenzen liegt die Vermutung nahe, dass *Cygb1* eine bis dahin neue Funktion für *Cygb* entwickelt hat. Die Entwicklung dieser neuen Funktion und die Lokalisation in Blutgefäßen zeigen, dass sich die duplizierten *Cygb*-Gene nicht nur die Funktionen des Vorläufer-*Cygb*s teilen (Subfunktionalisierung), sondern neue Funktionen entwickelt wurden (Subneofunktionalisierung). Das führte vermutlich zur dauerhaften Manifestierung der duplizierten *Cygb*-Gene im Genom von nahezu allen Teleostei.

4.4 Multiple Mb-Gene

4.4.1 Entwicklung von multiplen Mb-Genen in Fischen

Neben den multiplen Mb-Genen in Flösselhechtartigen konnten bereits multiple Mb-Gene im Karpfen, im Goldfisch, im Westafrikanischen Lungenfisch, in der Regenbogenforelle, im Asiatischen Gabelbart, im Silbergabelbart und im Froschwels beschrieben werden (Fraser et al. 2006; Roesner et al. 2008; Koch et al. 2016; Li et al. 2018; Gallagher und Macqueen 2017). Die Aufspaltung dieser Linien seit ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren ist etwa 450 Millionen Jahre her (Betancur et al. 2013; Panopoulou und Poustka 2005; Berthelot et al. 2014) (Abb. 53, 1.6, B, I).

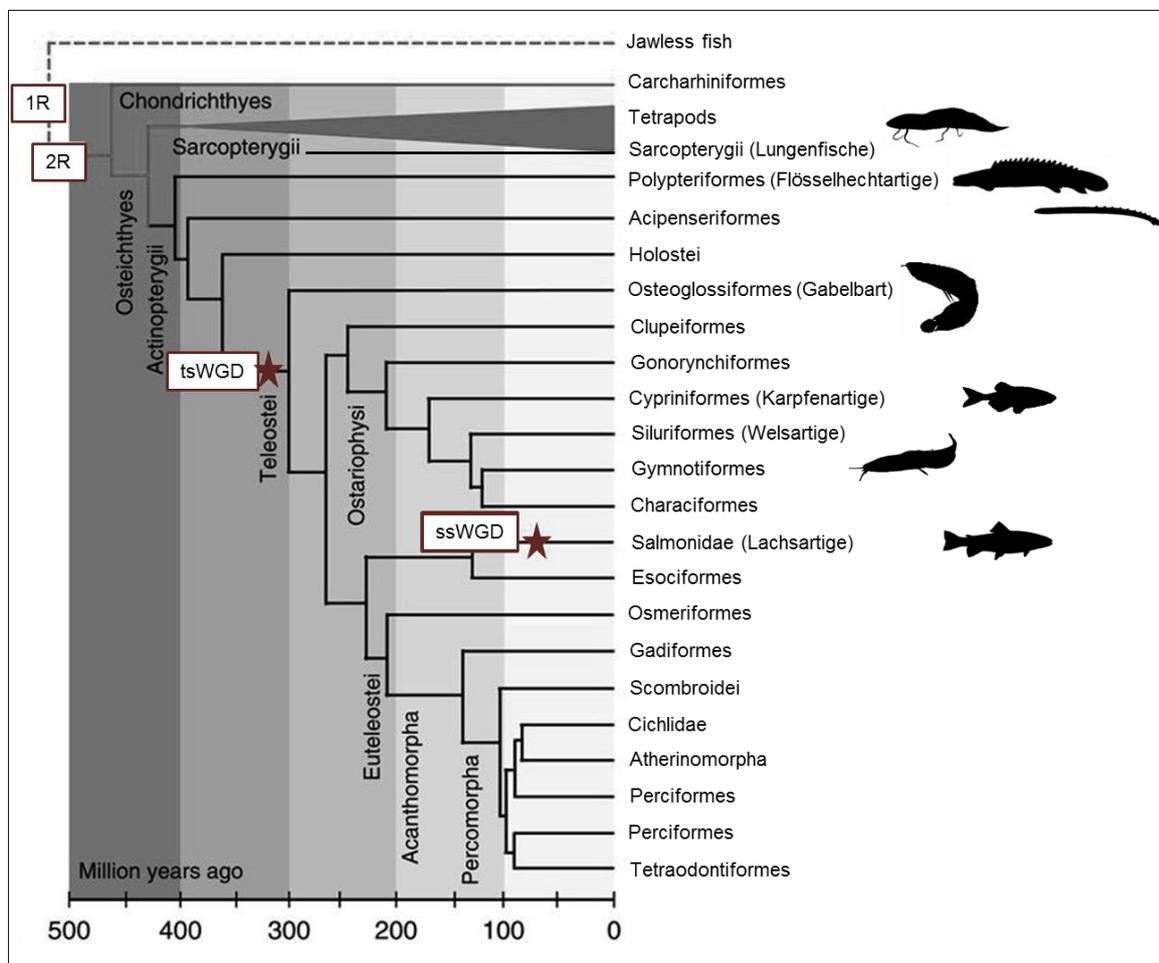


Abbildung 53 Übersicht der WGD-Events während der Vertebratenevolution

Dargestellt sind die zwei *whole genome duplications* (WGD), die in der frühen Vertebratenentwicklung aufgetreten sind (1R, 2R). Die fischspezifischen WGD fanden in echten Knochenfischen (*teleost-specific-genome-duplication*, tsWGD) und Lachsartigen (*salmonid-specific WGD*, ssWGD) statt. Abbildung vereinfacht und erweitert nach (Berthelot et al. 2014).

Die hier durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die multiplen Mb-Gene in Fischen nicht im letzten gemeinsamen Vorfahren entstanden sind, sondern sich sechsmal konvergent entwickelt haben. Die multiplen Mb-Gene in den Flösselhechtartigen, den Karpfenartigen und den Gabelbartartigen sind jedoch jeweils im letzten gemeinsamen Vorfahren entstanden. Das wird dadurch ersichtlich, dass die multiplen Mb-Gene der verschiedenen Arten innerhalb der unterschiedlichen Gruppen teilweise Schwesterngruppen bilden (Abb. 44). Die phylogenetischen Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass die multiplen Mb-Gene vom Westafrikanischen Lungenfisch und von den Flösselhechtartigen jeweils ein Monophylum bilden und sich dadurch klar voneinander abtrennen. Innerhalb der Welsartigen weist nur der Froschwels multiple Mb-Gene auf. Diese scheinen ausschließlich im Froschwels selbst entstanden zu sein, da die Mb-Gene der anderen Welsartigen in keinem Schwesterngruppenverhältnis zu einem der multiplen Mb-Gene des Froschwelses stehen. Teilweise zeigen die Mb-Gene deutlich erhöhte Substitutionsraten auf, was darauf hindeutet, dass einige dieser multiplen Mb-Gene im Laufe der Evolution sehr schnell divergierten. Wie bereits unter Punkt 4.1 beschrieben evolvierten die multiplen Mb-Gene des Westafrikanischen Lungenfisches $\sim 2,2$ -mal schneller als die Mb-Gene der Tetrapoden und $\sim 4,5$ -mal schneller als die der Teleostei (Koch et al. 2016). Die erhöhte Substitutionsrate der multiplen Mb-Gene ist vermutlich auf einen nachlassenden Selektionsdruck nach einer funktionellen Differenzierung und gewebespezifischen Expression der duplizierten Gene zurückzuführen (Helbo et al. 2012). Bei den Lachsartigen (hier durch die Regenbogenforelle und durch den Atlantischen Lachs vertreten) weist nur die Regenbogenforelle duplizierte Mb-Kopien auf. Da es in den Lachsartigen zu einer gesonderten *whole genome duplication (salmonid-specific WGD, ssWGD)* gekommen ist (Macqueen und Johnston 2014; Lien et al. 2016), liegt die Vermutung nahe, dass das duplizierte Mb-Gen der Regenbogenforelle auf dieses Ereignis zurückzuführen ist und der Atlantische Lachs vermutlich eines der duplizierten Mb-Gene verloren hat. Bei einem der duplizierten Mb-Gene der Regenbogenforelle handelt es sich um ein Pseudogen, was darauf hindeutet, dass Lachsartige möglicherweise kein weiteres Mb-Gen benötigen. Dies würde ebenfalls den Verlust eines der duplizierten Mb-Gene im Atlantischen Lachs erklären. In den Welsartigen hingegen scheinen die duplizierten Mb-Gene nicht im letzten gemeinsamen Vorfahren entstanden zu sein, sondern ausschließlich im Froschwels selbst. Neben den multiplen Mb-Sequenzen des Froschwelses wurden weitere Mb-Sequenzen von verschiedenen Wels-Arten in den Stammbaum eingespeist. Diese bilden gemeinsam mit den multiplen Mb-Sequenzen des Froschwelses ein Monophylum, stehen aber in keinem Schwesterngruppen-

Verhältnis zu einer der multiplen Mb-Sequenzen des Froschwelses. Die Entstehung der multiplen Mb-Gene des Froschwelses sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt, da keine Informationen zu den chromosomalen Lokalisationen vorliegen. Erste Sequenzanalysen zeigen jedoch, dass es sich bei der Entstehung der multiplen Mb-Gene vermutlich um Tandemduplikationen handelt (Li et al. 2018).

Lungenfische besitzen mit einem C-Wert von 40 pg - 133 pg das größte bekannte Genom aller Lebewesen. Das Genom von Flösselhechtartigen ist mit einem C-Wert von 3,7 pg - 7,3 pg wesentlich kleiner als das von Lungenfischen, ist aber im Vergleich zum Genom von Karpfen (1,8 pg), Zebrafischen (1,8 pg) und Menschen (3,5 pg) relativ groß. Obwohl Lungenfische das größte Genom besitzen, gibt es keine Hinweise für eine spezifische Polyploidization (Vervoort 1980). Eine fischspezifische Genomverdopplung fand nach der Divergenz von Strahlenflossern (Actinopterygii) und Fleischflossern (Sarcopterygii) ausschließlich in den Teleostei statt (tsWGD, Abb. 53) (Panopoulou und Poustka 2005; Hoegg et al. 2004; Kuraku und Meyer 2009; Meyer und Schartl 1999), zu denen weder die Lungenfische noch die Flösselhechtartigen zählen. Dennoch ist das Genom der Lungenfische und der Flösselhechtartigen größer als das der meisten Teleostei. Die Expansion der Genome und die Entstehung der multiplen Mb-Gene ist demnach vermutlich Resultat von spezifischen Genduplikationen und steht in keinem direkten Zusammenhang zu der Größe des jeweiligen Genoms. Zudem beschreibt das C-Wert-Paradoxon, dass es keine Korrelation zwischen der Genomgröße und der Organisationshöhe gibt. So haben beispielweise einige Amphibien und Amöben höhere C-Werte als komplexere Säugetiere³⁵. Grund hierfür ist v.a. nicht-codierende-DNA, die überwiegend aus repetitiven Sequenzen besteht (Taft et al. 2007). Um die Entstehung der multiplen Mb-Gene genauer zu verstehen, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.4.2 Gründe für die Entstehung von multiplen Mb-Genen

Während bei den meisten Vertebraten das Vorhandensein einer einzelnen Mb-Kopie ausreicht, scheint in einigen Fischarten die Entstehung von multiplen Mb-Genen von Vorteil zu sein. So konnten beispielweise im Karpfen (*Cyprinus carpio*) und dem Goldfisch (*Carassius auratus*) zwei Mb-Isoformen (Mb1 und Mb2) beschrieben werden (Fraser et al. 2006; Roesner et al. 2008). Während Mb1 eher ein ubiquitäres Expressionsmuster aufzeigt, wird Mb2 im Gehirn

³⁵ <http://www.genomesize.com/> (29.08.2019)

exprimiert. Funktionelle Untersuchungen konnten zeigen, dass Mb1 als Sauerstofftransportprotein fungiert und eine Rolle im NO-Metabolismus spielt. Mb2 hingegen scheint an der Detoxifizierung von ROS beteiligt zu sein (Fraser et al. 2006; Roesner et al. 2008; Cossins et al. 2009; Helbo et al. 2012). Die Mb-Isoformen zeigen unterschiedliche biochemische Eigenschaften. So ist beispielsweise die Sauerstoffaffinität von Mb1 (P_{50} 1,0 Torr) im Vergleich zu Mb2 (P_{50} 1,7 Torr) höher. Insgesamt ist die Sauerstoffaffinität von Mb in Fischen weitaus variabler als die in Säugetieren. Die Sauerstoffaffinität von Mb der Regenbogenforelle liegt bei P_{50} 4,9 Torr und die der Makrele bei P_{50} 2,0 Torr. Die unterschiedlichen Sauerstoffaffinitäten von Fischen sind vermutlich auf die variablen physiologischen Bedingungen und den unterschiedlichen O_2 -Bedarf in Gewässern zurückzuführen (Helbo et al. 2012). Neben der stärkeren Sauerstoffaffinität zeigt Mb1 eine schnellere Nitritreduktase-Aktivität auf, während Mb2 über eine höhere Peroxidase-Aktivität verfügt. Vermutlich schützt Mb2 die Neuronen im Gehirn des Hypoxie-toleranten Karpfens vor oxidativem Stress, indem es beispielweise an der Detoxifizierung von H_2O_2 beteiligt ist (Helbo et al. 2012). Zu den multiplen Mb-Genen des Froschwelses ist weitaus weniger bekannt. Dennoch konnten erste Untersuchungen zeigen, dass die Mb-Gene unterschiedliche Expressionsmuster aufzeigen, wobei die Hauptexpressionsorte das Gehirn und das Herz sind. Mit einem FPKM (*Fragments Per Kilobase per Million mapped fragments*) von 838,66 wird Mb3 am stärksten im Gehirn des Froschwelses exprimiert, gefolgt von einer Expression von 643,35 im Herzen (Li et al. 2018). Im Westafrikanischen Lungenfisch konnten sieben unterschiedliche Mb-Gene beschrieben werden, die vermutlich unterschiedliche Funktionen ausüben. Dafür sprechen die hohen Sequenz-Variabilitäten, die verschiedenen Expressionsmuster und der unterschiedliche Einfluss der Mb-Gene auf die Vitalität von neuronalen Zellen unter Hypoxie. Am stärksten werden PanMb2, PanMb3 und PanMb5 im Gehirn exprimiert (Koch et al. 2016). Lungenfische sind obligate Luftatmer, die in Süßwassergewässern mit niedrigen und/oder schwankenden Sauerstoffkonzentrationen leben. Da das Gehirn von Vertebraten sehr sensitiv in Bezug auf einen Sauerstoffmangel ist, wäre es möglich, dass die PanMb-Gene die Neuronen des Gehirns, auch bei niedrigen oder schwankenden Sauerstoffkonzentrationen, ausreichend mit O_2 versorgen (Koch et al. 2016). Lungenfische sind in der Lage, langanhaltende Trockenperioden zu überstehen (Ästivation), indem sie sich in einen Schlammkokon hüllen und in den Boden eingraben. So können sie ohne Wasser- und Nahrungszufuhr bis zu sieben Jahre überleben. Während der Ästivation wird der Energiemetabolismus runtergefahren und die Genexpression von zytoprotektiven Genen verstärkt (Hiong et al. 2013). Möglicherweise sind einige der

multiplen PanMb-Gene Bestandteil des zytoprotektiven Mechanismus, indem sie den Organismus vor ROS schützen (Koch et al. 2016). Im Gegensatz zu Lungenfischen sind Flösselhechtartige (Polypteriformes) nicht in der Lage, eine so extreme Form der Ästivation auszuführen (Babiker 1984). Flösselhechtartige besitzen jedoch auch Lungen, die es ihnen ermöglichen, seichte und sumpfige Gewässer im gesamten tropischen Afrika mit häufig schwankenden und niedrigen Sauerstoffkonzentrationen zu bewohnen. Die obligate Luftatmung ermöglicht den Flösselhechtartigen nicht nur eine ausreichende Sauerstoffzufuhr bei sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen, sondern stellt auch eine ausreichende Versorgung bei extrem hohen Aktivitäten sicher (Magid 1967). Der Flösselhecht und der Flösselaal sind beide in der Lage, sich über große Entfernungen terrestrisch fortzubewegen (Pace und Gibb 2011; Standen et al. 2014). Während der Flösselaal zur Fortbewegung seinen Körper schlangenartig und wellenförmig bewegt, nutzt der Flösselhecht sowohl seine Körperbewegung als auch seine Brustflossen, um sich über Land zu bewegen. In den Jahrmillionen der Evolutionsgeschichte der Flösselhechtartigen kann diese terrestrische Fortbewegung in Perioden der Dürre von großem Vorteil gewesen sein (Du et al. 2016). Sowohl Lungenfische als auch Flösselhechtartige sind sehr ursprüngliche Vertreter der Knochenfische (Abb. 6). Sie besitzen beide Lungen und sind obligate Luftatmer, was sie dazu befähigt, in Gewässern mit schwankenden und niedrigen Sauerstoffkonzentrationen zu leben. Im Laufe der Evolution kam es im Westafrikanischen Lungenfisch und in Flösselhechtartigen zur konvergenten Entstehung von multiplen Mb-Genen (siehe 4.4.1, Abb. 44). Diese konvergente Entwicklung der multiplen Mb-Gene legt die Vermutung nahe, dass es sich hier um eine optimale Anpassung an die sich ähnelnden Lebensräume handelt. Ähnlich wie im Lungenfisch ist im Senegal-Flösselhecht der Hauptexpressionsort der multiplen Mb-Gene das Gehirn (Abb. 46, A). Im Flösselhecht werden nahezu alle Mb-Gene im Gehirn exprimiert (1.6, B, II, a). Möglicherweise schützten die multiplen Mb-Gene, ähnlich wie im Lungenfisch, das Gehirn vom Flösselhecht vor oxidativem Stress und stellen eine ausreichende Sauerstoffversorgung sicher. Die stärkste Genexpression konnte im Flösselhecht jedoch im Herzen und im Auge nachgewiesen werden. Eine starke Genexpression von Mb im Herzen konnte bereits in Säugetieren beschrieben werden. Hier transportiert Mb O₂ vom Sarkolemm zu den Mitochondrien der Herzzellen (Wittenberg 2003). Im Herzen des Flösselhechts übernimmt möglicherweise Mb2a den Sauerstofftransport zu den Mitochondrien. Im Auge des Flösselhechts konnte neben einer hohen Genexpression von Mb2a auch eine hohe Genexpression für Mb3 ermittelt werden. Im Auge von Vögeln konnten große Mengen von Globin E nachgewiesen

werden. Hierbei stellt Globin E vermutlich ausreichend Sauerstoff für die metabolisch aktive Retina bereit (Blank et al. 2011a). Globin E und Mb stehen in einem Schwesterngruppen-Verhältnis zueinander (Abb. 3) und sind möglicherweise in der Lage, ähnliche oder gleiche Funktionen auszuüben (Burmester und Hankeln 2014). Demzufolge wäre es möglich, dass PseMb2a und PseMb3, ähnlich wie Globin E in Vögeln, das Auge vom Flösselhecht ausreichend mit Sauerstoff versorgen. In den Gonaden des Flösselhechts konnten ebenfalls hohe Genexpressionen gemessen werden (PseMb5, PseMb7a). Auch hier bestehen Ähnlichkeiten zu der Expression von Globin E. Im Südamerikanischen Lungenfisch konnten multiple Globin E Gene beschrieben werden, die eine extrem hohe Expression in den Ovarien zeigen (Lüdemann et al. 2019). Kinetische Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass Globin E in den Ovarien des Südamerikanischen Lungenfisches als Sauerstofftransportprotein fungiert und am NO-Metabolismus beteiligt ist (Lüdemann et al. 2019). Auch hier wäre es möglich, dass funktionelle Ähnlichkeiten zu den in den Gonaden exprimierten Mb-Genen des Flösselhechts bestehen. Die Genexpression der multiplen Mb-Gene des Flösselaals ist insgesamt ubiquitärer (1.6, B, II, a). Es werden nahezu alle Mb-Gene in allen Geweben exprimiert, wobei die höchsten Expressionswerte in der Lunge, in den Kiemen, im Gehirn, im Muskel und im Herzen vorliegen (Abb. 49). Im Gehirn wäre es möglich, dass einige der multiplen Mb-Gene, ähnlich wie im Lungenfisch und im Flösselhecht, eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleisten und vor oxidativem Stress schützen. Im Herzen könnten die stark exprimierten Mb-Gene Sauerstoff zu den Mitochondrien transportieren. Die starke Expression einiger Mb-Gene in der Lunge und in den Kiemen des Flösselaals legen die Vermutung nahe, dass diese Mb-Proteine Sauerstoff an respiratorischen Oberflächen binden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fische, die multiple Mb-Gene besitzen, sich an ähnliche abiotische Faktoren angepasst haben. So leben Karpfen, Goldfische, Lungenfische und auch Flösselhechtartige in Gewässern mit schwankenden und niedrigen Sauerstoffkonzentrationen. Goldfische sind beispielweise an anoxische Perioden adaptiert (Lushchak et al. 2001), Lungenfische können langanhaltende Trockenperioden überstehen und verfügen, ebenso wie Flösselhechtartige, über Lungen, was ihnen das Einatmen atmosphärischer Luft ermöglicht. Durch Phasen der Hypoxie und Reoxygenierung ist eine physiologische Anpassung, die eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet und vor oxidativem Stress schützt, unabdingbar. Vermutlich spielen die multiplen Mb-Gene in diesem

Zusammenhang eine wichtige Rolle und schützen insbesondere das Gehirn vor Sauerstoffmangel und oxidativem Stress.

4.4.3 Das evolutionäre Schicksal der multiplen Mb-Gene

Die phylogenetischen Untersuchungen, die Sequenzanalysen sowie die Genexpressionsanalysen geben erste Hinweise auf das evolutionäre Schicksal der multiplen Mb-Gene in den Flösselhechtartigen (1.6, B, II, i). Die phylogenetischen Untersuchungen zeigen, dass die Mb1-Sequenzen und die Mb3-Sequenzen der Flösselhechtartigen sowie die Mb2-Sequenzen der Flösselhechte niedrigere Substitutionsraten im Vergleich zu den restlichen Mb-Sequenzen zeigen. Die Sequenzanalysen zeigen, dass Mb1 des Flösselhechts und des Flösselaals die höchste Übereinstimmung zu der *single copy* Mb-Sequenz des Pottwals aufweisen. Die niedrigen Substitutionsraten und die hohe Übereinstimmung zur *single copy* Mb-Sequenz legen die Vermutung nahe, dass Mb1 der Flösselhechtartigen die ursprüngliche Funktion des Vorläufer-Mbs beibehalten hat. Mb1 wird im Flösselhecht und im Flösselaal in diversen Geweben exprimiert. In beiden Arten weist Mb1 aber ein Expressionsmaximum in der Lunge und im Herzen auf, was auf eine respiratorische Funktion hindeuten könnte. Im Durchschnitt sind die Mb-Gene des Flösselhechts zu 61 % identisch und weisen Sequenzunterschiede bis zu 67 % auf. Die Mb-Gene des Flösselaals sind im Durchschnitt zu 57 % identisch, wobei Sequenzunterschiede bis zu 68 % bestehen. Ähnliche Sequenzdivergenzen konnten auch bei den multiplen Mb-Genen des Westafrikanischen Lungenfisches beschrieben werden. Diese hohe Sequenzvariabilität im Westafrikanischen Lungenfisch, und somit eventuell auch in den Flösselhechtartigen, deutet auf unterschiedliche Funktionen der multiplen Mb-Gene hin (Koch et al. 2016). Die Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass nahezu alle multiplen Mb-Gene des Flösselhechts im Gehirn exprimiert werden. Das Gehirn als Hauptexpressionsort ist besonders auffällig, da die meisten Mb-Gene in keinem weiteren Gewebe exprimiert werden. Möglicherweise kommt es im Gehirn des Flösselhechts zu einer Funktionsverstärkung der Mb-Gene, was auf einen additiven Effekt hindeuten würde. PseMb1, PseMb2a, PseMb3, PseMb5a und PseMb7a werden noch in weiteren Geweben exprimiert, wobei PseMb2a die stärksten Expressionswerte im Herzen und im Auge aufweist. Die unterschiedlichen Expressionsmuster und die hohe Sequenzvariabilität deuten auf unterschiedliche Funktionen (Subfunktionalisierung, Neofunktionalisierung oder Subneofunktionalisierung) dieser multiplen Mb-Gene hin. Im Gegensatz zu den multiplen Mb-Genen des Flösselhechts zeigen die

Mb-Gene des Flösselaals ein eher ubiquitäres Expressionsmuster auf. Möglichweise kommt es auch hier zu einer Funktionsverstärkung der multiplen Mb-Gene. Die Sequenzdivergenzen deuten jedoch eher darauf hin, dass die multiplen Mb-Gene des Flösselaals unterschiedliche Funktionen übernehmen (Subfunktionalisierung, Neofunktionalisierung oder Subneofunktionalisierung). Die Mb-Gene des Flösselaals sind ohne Ausnahme vollständig kodierende Gene. Im Flösselhecht hingegen liegen vier Pseudogene vor. Es liegt also eine Expansion der Mb-Gene durch Amplifikation im Flösselaal und eine Reduktion durch Pseudogenisierung im Flösselhecht vor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die multiplen Mb-Gene des Senegal-Flösselhechts möglicherweise einen additiven Effekt im Gehirn ausüben. Die hohen Substitutionsraten, die starken Sequenzvariabilitäten und die unterschiedlichen Expressionsmuster der multiplen Mb-Gene in den Flösselhechtartigen deuten jedoch auf unterschiedliche Funktionen hin. Um ein besseres Verständnis des evolutionären Schicksals der multiplen Mb-Gene zu erhalten, sollten funktionelle und kinetische Untersuchungen durchgeführt werden.

5 **Ausblick**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die duplizierten *Cygb*-Gene in Teleostei unterschiedliche Funktionen ausüben. Es ist sehr wahrscheinlich, dass *Cygb1* als Sauerstoffspeicher und/oder als Sauerstofftransportprotein fungiert und *Cygb2* an der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist. Die Analyse der *Cygb1*-Knockout-Transkriptome zeigt zudem eine Verbindung von *Cygb1* und der Biosynthese und/oder dem Transport von Cholesterin und weiteren Lipiden auf. Um die Verbindung von *Cygb1* und Cholesterin und Lipiden besser zu verstehen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Um zu überprüfen, ob *Cygb1* möglicherweise als Cholesterin-Transportprotein fungiert, könnten Experimente durchgeführt werden, in denen die Bindung von *Cygb1* und Cholesterin untersucht wird. Eine vergleichbare Studie wurde bereits für Hämoglobin durchgeführt und ergab, dass Hämoglobin Cholesterin mit einer hohen Affinität bindet (Nikolić et al. 2004). Eine Beteiligung von *Cygb1* an der Biosynthese von Cholesterin könnte untersucht werden, indem Cholesterin aus der gleichen Menge an Gewebe aus der *Cygb1*-Knockoutmutante und einem *Cygb1*-Wildtypen isoliert wird. Wenn *Cygb1* maßgeblich an der Biosynthese von Cholesterin beteiligt ist, wäre die Cholesterin-Konzentration im *Cygb1*-

Knockout geringer. Ähnliche Untersuchungen und Experimente könnten mit weiteren Lipiden durchgeführt werden. Um die Funktionen von *Cygb2* noch genauer zu untersuchen, sollten *Cygb2*-Knockoutmutanten generiert werden. Basierend auf den hier durchgeführten Stressversuchen und Genexpressionsanalysen, wäre es sinnvoll die Gehirn-Transkriptome unter Kontroll-Bedingungen und ROS-Stress-Bedingungen der *Cygb2*-Knockoutmutante im Vergleich zu *Cygb2*-Wildtypen zu analysieren.

Neben dem Froschwels besitzen der Senegal-Flösselhecht und der Flösselaal die meisten bisher bekannten Mb-Gene. Die 15 Mb-Kopien der Flösselhechtartigen wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation durch bioinformatische Arbeiten entdeckt und konnten durch erste experimentelle Untersuchungen genauer beschrieben werden. Die durchgeführten Analysen zeigen, dass die multiplen Mb-Gene der Flösselhechtartigen hohe Aminosäuresequenzdivergenzen aufzeigen und unterschiedlich exprimiert werden. Im Senegal-Flösselhecht werden jedoch nahezu alle Mb-Gene im Gehirn exprimiert, wohingegen die Mb-Gene des Flösselaals ein eher ubiquitäres Genexpressionsmuster aufzeigen. Um genauer zu untersuchen, ob die multiplen Mb-Gene unterschiedliche Funktionen ausüben, sollten kinetische Untersuchungen (z.B.: Sauerstoffaffinität, Nitritreduktase-Aktivität, Lipidbindeeigenschaften) durchgeführt werden. Des Weiteren könnten die Funktionen der multiplen Mb-Gene in Zellkulturexperimenten untersucht werden. Ähnliche Untersuchungen wurden bereits mit den multiplen Mb-Genen des Westafrikanischen Lungenfisches durchgeführt (Koch et al. 2016). Interessanterweise verfügt der Westafrikanische Lungenfisch weder über ein Neuroglobin-Gen noch über ein Cytoglobin-Gen. Vermutlich haben die multiplen Mb-Gene des Lungenfisches die Funktionen von Neuroglobin und Cytoglobin übernommen. Auch bei den Flösselhechtartigen könnte dies der Fall sein. In nachfolgenden Analysen könnten die frei zugänglichen Transkriptome der Flösselhechte nach anderen Globinen abgesucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Alzawahra WF, Talukder MH, Liu X, Samouilov A, Zweier JL (2008) Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 295 (2):H499-H508
- Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH (1998) Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282 (5394):1711-1714
- Avivi A, Gerlach F, Joel A, Reuss S, Burmester T, Nevo E, Hankeln T (2010) Neuroglobin, cytoglobin, and myoglobin contribute to hypoxia adaptation of the subterranean mole rat *Spalax*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (50):21570-21575. doi:10.1073/pnas.1015379107
- Awenius C, Hankeln T, Burmester T (2001) Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochem Biophys Res Commun* 287 (2):418-421. doi:10.1006/bbrc.2001.5614
- Babiker MM (1984) Adaptive respiratory significance of organophosphates (ATP & GTP) in air-breathing fishes. *Hydrobiologia* 110 (1):339-349. doi:10.1007/bf00025807
- Bartsch P (2010) Actinopterygii, Strahl (en) flosser. In: *Spezielle Zoologie*. Springer, pp 244-306
- Baum DA, Larson A (1991) Adaptation reviewed: a phylogenetic methodology for studying character macroevolution. *Systematic Biology* 40 (1):1-18
- Beckerson P, Wilson MT, Svistunenko DA, Reeder BJ (2015) Cytoglobin ligand binding regulated by changing haem-co-ordination in response to intramolecular disulfide bond formation and lipid interaction. *Biochem J* 465 (1):127-137. doi:10.1042/BJ20140827
- Bekker A, Holland HD, Wang PL, Rumble D, 3rd, Stein HJ, Hannah JL, Coetzee LL, Beukes NJ (2004) Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* 427 (6970):117-120. doi:10.1038/nature02260
- Bentmann A, Schmidt M, Reuss S, Wolfrum U, Hankeln T, Burmester T (2005) Divergent distribution in vascular and avascular mammalian retinae links neuroglobin to cellular respiration. *J Biol Chem* 280 (21):20660-20665. doi:10.1074/jbc.M501338200
- Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, Juanchich A, Bernard M, Noël B, Bento P, Da Silva C, Labadie K, Alberti A (2014) The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature communications* 5:3657
- Betancur RR, Broughton RE, Wiley EO, Carpenter K, Lopez JA, Li C, Holcroft NI, Arcila D, Sanciangco M, Cureton li JC, Zhang F, Buser T, Campbell MA, Ballesteros JA, Roa-Varon A, Willis S, Borden WC, Rowley T, Reneau PC, Hough DJ, Lu G, Grande T, Arratia G, Orti G (2013) The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS Curr* 5. doi:10.1371/currents.tol.53ba26640df0c9ae75bb165c8c26288
- Bicker A, Dietrich D, Gleixner E, Kristiansen G, Gorr TA, Hankeln T (2014) Extensive transcriptional complexity during hypoxia-regulated expression of the myoglobin gene in cancer. *Hum Mol Genet* 23 (2):479-490. doi:10.1093/hmg/ddt438
- Björkhem I, Meaney S (2004) Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24 (5):806-815
- Blank M, Burmester T (2012) Widespread occurrence of N-terminal acylation in animal globins and possible origin of respiratory globins from a membrane-bound ancestor. *Mol Biol Evol* 29 (11):3553-3561. doi:10.1093/molbev/mss164
- Blank M, Kiger L, Thielebein A, Gerlach F, Hankeln T, Marden MC, Burmester T (2011a) Oxygen supply from the bird's eye perspective: globin E is a respiratory protein in the chicken retina. *J Biol Chem* 286 (30):26507-26515. doi:10.1074/jbc.M111.224634
- Blank M, Wollberg J, Gerlach F, Reimann K, Roesner A, Hankeln T, Fago A, Weber RE, Burmester T (2011b) A Membrane-Bound Vertebrate Globin. *Plos One* 6 (9). doi:ARTN e25292 10.1371/journal.pone.0025292
- Bonamore A, Farina A, Gattoni M, Schinina ME, Bellelli A, Boffi A (2003) Interaction with membrane lipids and heme ligand binding properties of *Escherichia coli* flavohemoglobin. *Biochemistry* 42 (19):5792-5801. doi:10.1021/bi0206311
- Braasch I, Brunet F, Volff JN, Scharl M (2009a) Pigmentation pathway evolution after whole-genome duplication in fish. *Genome Biol Evol* 1:479-493. doi:10.1093/gbe/evp050
- Braasch I, Volff JN, Scharl M (2009b) The endothelin system: evolution of vertebrate-specific ligand-receptor interactions by three rounds of genome duplication. *Mol Biol Evol* 26 (4):783-799. doi:10.1093/molbev/msp015
- Brunori M, Giuffrè A, Nienhaus K, Nienhaus GU, Scandurra FM, Vallone B (2005) Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (24):8483-8488. doi:10.1073/pnas.0408766102
- Brunori M, Vallone B (2007) Neuroglobin, seven years after. *Cell Mol Life Sci* 64 (10):1259-1268. doi:10.1007/s00018-007-7090-2
- Burmester T (2002) Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp Physiol B* 172 (2):95-107

- Burmester T, Ebner B, Weich B, Hankeln T (2002) Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol* 19 (4):416-421
- Burmester T, Haberkamp M, Mitz S, Roesner A, Schmidt M, Ebner B, Gerlach F, Fuchs C, Hankeln T (2004) Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution. *IUBMB Life* 56 (11-12):703-707. doi:10.1080/15216540500037257
- Burmester T, Hankeln T (2007) The respiratory proteins of insects. *J Insect Physiol* 53 (4):285-294. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.12.006
- Burmester T, Hankeln T (2009) What is the function of neuroglobin? *Journal of Experimental Biology* 212 (10):1423-1428. doi:10.1242/jeb.000729
- Burmester T, Hankeln T (2014) Function and evolution of vertebrate globins. *Acta Physiol (Oxf)* 211 (3):501-514. doi:10.1111/apha.12312
- Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* 407 (6803):520-523. doi:10.1038/35035093
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1):156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999
- Corti P, Ieraci M, Tejero J (2016a) Characterization of zebrafish neuroglobin and cytoglobins 1 and 2: Zebrafish cytoglobins provide insights into the transition from six-coordinate to five-coordinate globins. *Nitric Oxide* 53:22-34. doi:10.1016/j.niox.2015.12.004
- Corti P, Xue JM, Tejero J, Wajih N, Sun M, Stolz DB, Tsang M, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT (2016b) Globin X is a six-coordinate globin that reduces nitrite to nitric oxide in fish red blood cells. *P Natl Acad Sci USA* 113 (30):8538-8543. doi:10.1073/pnas.1522670113
- Cossins AR, Williams DR, Foulkes NS, Berenbrink M, Kipar A (2009) Diverse cell-specific expression of myoglobin isoforms in brain, kidney, gill and liver of the hypoxia-tolerant carp and zebrafish. *J Exp Biol* 212 (Pt 5):627-638. doi:10.1242/jeb.026286
- Dai Y, Tang J, Zhang JH (2005) Role of Cl⁻ in cerebral vascular tone and expression of Na⁺-K⁺-2Cl⁻-co-transporter after neonatal hypoxia-ischemia. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 83 (8-9):767-773
- Datta P, Chakrabarty S, Chakrabarty A, Chakrabarti A (2008) Membrane interactions of hemoglobin variants, HbA, HbE, HbF and globin subunits of HbA: Effects of aminophospholipids and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1778 (1):1-9
- Decker H, van Holde KE (2011) Oxygen and the evolution of life. *Choice: Current Reviews for Academic Libraries* 48 (10):1941-1941
- Dehal P, Boore JL (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol* 3 (10):e314. doi:10.1371/journal.pbio.0030314
- Dewilde S, Kiger L, Burmester T, Hankeln T, Baudin-Creuzat V, Aerts T, Marden MC, Caubergs R, Moens L (2001) Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J Biol Chem* 276 (42):38949-38955. doi:10.1074/jbc.M106438200
- Dickerson RE (1983) Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology.
- Dirscherl H, Yoder JA (2014) Characterization of the Z lineage Major histocompatibility complex class I genes in zebrafish. *Immunogenetics* 66 (3):185-198
- Droge J, Pande A, Englander EW, Makalowski W (2012) Comparative genomics of neuroglobin reveals its early origins. *PLoS One* 7 (10):e47972. doi:10.1371/journal.pone.0047972
- Du T, Larsson H, Standen E (2016) Observations of terrestrial locomotion in wild *Polypterus senegalus* from Lake Albert, Uganda. *African Journal of Aquatic Science* 41 (1):67-71
- Ebner B (2012) Phylogenetische und molekulare Analyse des Globin-Repertoires der Metazoa: Bedeutung für das Verständnis der Globingenfamilie der Wirbeltiere.
- Ebner B, Panopoulou G, Vinogradov SN, Kiger L, Marden MC, Burmester T, Hankeln T (2010) The globin gene family of the cephalochordate amphioxus: implications for chordate globin evolution. *BMC Evol Biol* 10:370. doi:10.1186/1471-2148-10-370
- Fabrizius A (2014) Untersuchungen zur Lokalisation und Expression des respiratorischen Proteins Neuroglobin bei Säugetieren. *Universitätsbibliothek Mainz*,
- Fabrizius A, Andre D, Laufs T, Bicker A, Reuss S, Porto E, Burmester T, Hankeln T (2016) Critical re-evaluation of neuroglobin expression reveals conserved patterns among mammals. *Neuroscience* 337:339-354. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.07.042
- Fang J, Ma I, Allalunis-Turner J (2011) Knockdown of cytoglobin expression sensitizes human glioma cells to radiation and oxidative stress. *Radiat Res* 176 (2):198-207
- Farmer EE, Mueller MJ (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual review of plant biology* 64:429-450
- Flögel U, GÖDECKE A, Klotz L-O, SCHRADER, JÜRGEN (2004) Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *The FASEB journal* 18 (10):1156-1158

- Flogel U, Merx MW, Godecke A, Decking UK, Schrader J (2001) Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2):735-740. doi:10.1073/pnas.011460298
- Flonta SE, Arena S, Pisacane A, Michieli P, Bardelli A (2009) Expression and Functional Regulation of Myoglobin in Epithelial Cancers. *Am J Pathol* 175 (1):201-206. doi:10.2353/ajpath.2009.081124
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151 (4):1531-1545
- Fraser J, de Mello LV, Ward D, Rees HH, Williams DR, Fang Y, Brass A, Gracey AY, Cossins AR (2006) Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (8):2977-2981. doi:10.1073/pnas.0508270103
- Freitas TA, Saito JA, Hou S, Alam M (2005) Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor. *J Inorg Biochem* 99 (1):23-33. doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.10.024
- Fuchs C, Burmester T, Hankeln T (2006) The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome. *Cytogenet Genome Res* 112 (3-4):296-306. doi:10.1159/000089884
- Fuchs C, Heib V, Kiger L, Haberkamp M, Roesner A, Schmidt M, Hamdane D, Marden MC, Hankeln T, Burmester T (2004) Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern, and ligand binding. *J Biol Chem* 279 (23):24116-24122. doi:10.1074/jbc.M402011200
- Fuchs C, Luckhardt A, Gerlach F, Burmester T, Hankeln T (2005) Duplicated cytoglobin genes in teleost fishes. *Biochem Biophys Res Commun* 337 (1):216-223. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.271
- Gagnon JA, Valen E, Thyme SB, Huang P, Akhmetova L, Pauli A, Montague TG, Zimmerman S, Richter C, Schier AF (2014) Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One* 9 (5):e98186. doi:10.1371/journal.pone.0098186
- Gallagher MD, Macqueen DJ (2017) Evolution and Expression of Tissue Globins in Ray-Finned Fishes. *Genome Biol Evol* 9 (1):32-47. doi:10.1093/gbe/evw266
- Garcia-Fernandez J, Holland PW (1994) Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* 370 (6490):563-566. doi:10.1038/370563a0
- Garrido C, Paul C, Seigneuric R, Kampinga HH (2012) The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *Int J Biochem Cell Biol* 44 (10):1588-1592. doi:10.1016/j.biocel.2012.02.022
- Garry DJ, Ordway GA, Lorenz LN, Radford NB, Chin ER, Grange RW, Bassel-Duby R, Williams RS (1998) Mice without myoglobin. *Nature* 395 (6705):905-908. doi:10.1038/27681
- Garvin J, Ortiz P (2003) The role of reactive oxygen species in the regulation of tubular function. *Acta physiologica Scandinavica* 179 (3):225-232
- Gibson J, Milner P, White R, Fairfax T, Wilkins R (2008) Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 455 (4):563-573
- Gödecke A, Flögel U, Zanger K, Ding Z, Hirchenhain J, Decking UK, Schrader J (1999) Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (18):10495-10500
- Gödecke A, Schrader J (2000) Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice—lessons from eNOS and myoglobin knockout mice. *Basic research in cardiology* 95 (6):492-498
- Good DW, Knepper MA, Burg MB (1984) Ammonia and bicarbonate transport by thick ascending limb of rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 247 (1):F35-F44
- Gorr TA, Wichmann D, Pilarsky C, Theurillat JP, Fabrizius A, Laufs T, Bauer T, Koslowski M, Horn S, Burmester T, Hankeln T, Kristiansen G (2011) Old proteins - new locations: myoglobin, haemoglobin, neuroglobin and cytoglobin in solid tumours and cancer cells. *Acta Physiol (Oxf)* 202 (3):563-581. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02205.x
- Greenberg DA, Jin K, Khan AA (2008) Neuroglobin: an endogenous neuroprotectant. *Curr Opin Pharmacol* 8 (1):20-24. doi:10.1016/j.coph.2007.09.003
- Gu X, Wang YF, Gu JY (2002) Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small-scale duplications in vertebrate evolution. *Nature Genetics* 31 (2):205-209. doi:10.1038/ng902
- Gu Z, Steinmetz LM, Gu X, Scharfe C, Davis RW, Li WH (2003) Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 421 (6918):63-66. doi:10.1038/nature01198
- Halligan KE, Jourd'heuil FL, Jourd'heuil D (2009) Cytoglobin is expressed in the vasculature and regulates cell respiration and proliferation via nitric oxide dioxygenation. *J Biol Chem* 284 (13):8539-8547. doi:10.1074/jbc.M808231200
- Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, Roesner A, Schmidt M, Weich B, Wystub S, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Bolognesi M, De Sanctis D, Marden MC, Kiger L, Moens L, Dewilde S, Nevo E, Avivi A, Weber RE, Fago A, Burmester T (2005) Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J Inorg Biochem* 99 (1):110-119. doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.11.009

- Hankeln T, Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Gerlach F, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Burmester T (2004) The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function? *IUBMB Life* 56 (11-12):671-679. doi:10.1080/15216540500037794
- Hardison RC (1996) A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (12):5675-5679
- Hardison RC (2008) Globin genes on the move. *J Biol* 7 (9):35. doi:10.1186/jbiol92
- Harrison PM, Hegyi H, Balasubramanian S, Luscombe NM, Bertone P, Echols N, Johnson T, Gerstein M (2002) Molecular fossils in the human genome: Identification and analysis of the pseudogenes in chromosomes 21 and 22. *Genome Research* 12 (2):272-280. doi:DOI 10.1101/gr.207102
- He X, Zhang J (2005) Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics* 169 (2):1157-1164. doi:10.1534/genetics.104.037051
- Helbo S, Dewilde S, Williams DR, Berghmans H, Berenbrink M, Cossins AR, Fago A (2012) Functional differentiation of myoglobin isoforms in hypoxia-tolerant carp indicates tissue-specific protective roles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302 (6):R693-701. doi:10.1152/ajpregu.00501.2011
- Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T (2008) Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (29):10256-10261. doi:10.1073/pnas.0801336105
- Herold S, Fago A, Weber RE, Dewilde S, Moens L (2004) Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. *J Biol Chem* 279 (22):22841-22847. doi:10.1074/jbc.M313732200
- Hiong KC, Ip YK, Wong WP, Chew SF (2013) Differential gene expression in the brain of the African lungfish, *Protopterus annectens*, after six days or six months of aestivation in air. *PLoS one* 8 (8):e71205
- Hodges NJ, Innocent N, Dhanda S, Graham M (2008) Cellular protection from oxidative DNA damage by over-expression of the novel globin cytoglobin in vitro. *Mutagenesis* 23 (4):293-298. doi:10.1093/mutage/gen013
- Hoegg S, Brinkmann H, Taylor JS, Meyer A (2004) Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J Mol Evol* 59 (2):190-203. doi:10.1007/s00239-004-2613-z
- Hoffmann FG, Opazo JC, Storz JF (2010a) Gene cooption and convergent evolution of oxygen transport hemoglobins in jawed and jawless vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (32):14274-14279. doi:10.1073/pnas.1006756107
- Hoffmann FG, Opazo JC, Storz JF (2011) Differential loss and retention of cytoglobin, myoglobin, and globin-E during the radiation of vertebrates. *Genome Biol Evol* 3:588-600. doi:10.1093/gbe/evr055
- Hoffmann FG, Opazo JC, Storz JF (2012) Whole-genome duplications spurred the functional diversification of the globin gene superfamily in vertebrates. *Mol Biol Evol* 29 (1):303-312. doi:10.1093/molbev/msr207
- Hoffmann FG, Storz JF, Gorr TA, Opazo JC (2010b) Lineage-specific patterns of functional diversification in the alpha- and beta-globin gene families of tetrapod vertebrates. *Mol Biol Evol* 27 (5):1126-1138. doi:10.1093/molbev/msp325
- Holland PW, Garcia-Fernandez J, Williams NA, Sidow A (1994) Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev Suppl*:125-133
- Holm L, Sander C (1993) Structural alignment of globins, phycocyanins and colicin A. *FEBS Lett* 315 (3):301-306
- Hoogewijs D, Ebner B, Germani F, Hoffmann FG, Fabrizius A, Moens L, Burmester T, Dewilde S, Storz JF, Vinogradov SN, Hankeln T (2012) Androglobin: a chimeric globin in metazoans that is preferentially expressed in mammalian testes. *Mol Biol Evol* 29 (4):1105-1114. doi:10.1093/molbev/msr246
- Hughes AL (1994) The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc Biol Sci* 256 (1346):119-124. doi:10.1098/rspb.1994.0058
- Hughes AL (1999) Phylogenies of developmentally important proteins do not support the hypothesis of two rounds of genome duplication early in vertebrate history. *J Mol Evol* 48 (5):565-576
- Hundahl CA, Elfving B, Muller HK, Hay-Schmidt A, Wegener G (2013) A gene-environment study of cytoglobin in the human and rat hippocampus. *PLoS One* 8 (5):e63288. doi:10.1371/journal.pone.0063288
- Inohara N, Nunez G (2000) Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell death and differentiation* 7 (5):509
- Jambunathan N (2010) Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. In: *Plant Stress Tolerance*. Springer, pp 291-297
- Jao L-E, Wenthe SR, Chen W (2013) Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (34):13904-13909
- Juncos R, Garvin JL (2005) Superoxide enhances Na-K-2Cl cotransporter activity in the thick ascending limb. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 288 (5):F982-F987
- Kakar S, Hoffmann FG, Storz JF, Fabian M, Hargrove MS (2010) Structure and reactivity of hexacoordinate hemoglobins. *Biophys Chem* 152 (1-3):1-14. doi:10.1016/j.bpc.2010.08.008

- Kane DA, Kimmel CB (1993) The zebrafish midblastula transition. *Development* 119 (2):447-456
- Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, Yoshizato K (2001) Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 276 (27):25318-25323. doi:10.1074/jbc.M102630200
- Kendrew J, Bodo G, Dintzis H, Parrish R, Wyckoff H (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181:662-666
- Khan AA, Wang YM, Sun YJ, Mao XO, Xie L, Miles E, Graboski J, Chen S, Ellerby LM, Jin KL, Greenberg DA (2006) Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia. *P Natl Acad Sci USA* 103 (47):17944-17948. doi:10.1073/pnas.0607497103
- Koch J, Burmester T (2016) Membrane-bound globin X protects the cell from reactive oxygen species. *Biochem Bioph Res Co* 469 (2):275-280. doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.105
- Koch J, Ludemann J, Spies R, Last M, Amemiya CT, Burmester T (2016) Unusual Diversity of Myoglobin Genes in the Lungfish. *Mol Biol Evol* 33 (12):3033-3041. doi:10.1093/molbev/msw159
- Kooyman GL, Ponganis PJ (1998) The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annu Rev Physiol* 60:19-32. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.19
- Kristiansen G, Hu JM, Wichmann D, Stiehl DP, Rose M, Gerhardt J, Bohnert A, ten Haaf A, Moch H, Raleigh J, Varia MA, Subarsky P, Scandurra FM, Gnaiger E, Gleixner E, Bicker A, Gassmann M, Hankeln T, Dahl E, Gorr TA (2011) Endogenous Myoglobin in Breast Cancer Is Hypoxia-inducible by Alternative Transcription and Functions to Impair Mitochondrial Activity A ROLE IN TUMOR SUPPRESSION? *J Biol Chem* 286 (50):43417-43428. doi:10.1074/jbc.M111.227553
- Kugelstadt D, Haberkamp M, Hankeln T, Burmester T (2004) Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken. *Biochem Biophys Res Commun* 325 (3):719-725. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.080
- Kuraku S (2008) Insights into Cyclostome Phylogenomics: Pre-2R or Post-2R? *Zool Sci* 25 (10):960-968. doi:10.2108/zsj.25.960
- Kuraku S, Meyer A (2009) The evolution and maintenance of Hox gene clusters in vertebrates and the teleost-specific genome duplication. *Int J Dev Biol* 53 (5-6):765-773. doi:10.1387/ijdb.072533km
- Kuraku S, Meyer A, Kuratani S (2009) Timing of Genome Duplications Relative to the Origin of the Vertebrates: Did Cyclostomes Diverge before or after? (vol 26, pg 47, 2009). *Molecular Biology and Evolution* 26 (3):713-713. doi:10.1093/molbev/msn304
- Kwiterovich Jr PO (2000) The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *The American journal of cardiology* 86 (12):5-10
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrum J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822):860-921. doi:10.1038/35057062
- Laufs TL (2010) Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der respiratorischen Proteine Neuroglobin (Ngb) und Cytoglobin (Cygb) in Säugern. Institut für Molekulargenetik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Dr rer nat, PDT Hankeln 191
- Le Guyader H, Lecointre G (2005) *Biosystematik: alle Organismen im Überblick*. Springer,
- Lepiller S, Franche N, Solary E, Chluba J, Laurens V (2009) Comparative analysis of zebrafish nos2a and nos2b genes. *Gene* 445 (1-2):58-65
- Leutner S, Eckert A, Müller W (2001) ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *Journal of neural transmission* 108 (8-9):955-967
- Li C, Orti G, Zhang G, Lu G (2007a) A practical approach to phylogenomics: the phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. *BMC Evol Biol* 7:44. doi:10.1186/1471-2148-7-44
- Li D, Chen XQ, Li WJ, Yang YH, Wang JZ, Yu AC (2007b) Cytoglobin up-regulated by hydrogen peroxide plays a protective role in oxidative stress. *Neurochem Res* 32 (8):1375-1380. doi:10.1007/s11064-007-9317-x
- Li N, Bao L, Zhou T, Yuan Z, Liu S, Dunham R, Li Y, Wang K, Xu X, Jin Y, Zeng Q, Gao S, Fu Q, Liu Y, Yang Y, Li Q, Meyer A, Gao D, Liu Z (2018) Genome sequence of walking catfish (*Clarias batrachus*) provides insights into terrestrial adaptation. *Bmc Genomics* 19 (1):952. doi:10.1186/s12864-018-5355-9
- Lien S, Koop BF, Sandve SR, Miller JR, Kent MP, Nome T, Hvidsten TR, Leong JS, Minkley DR, Zimin A, Grammes F, Grove H, Gjuvsland A, Walenz B, Hermansen RA, von Schalburg K, Rondeau EB, Di Genova A, Samy JKA, Vik JO, Vigeland MD, Caler L, Grimholt U, Jentoft S, Vage DI et al. (2016) The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature* 533 (7602):200-+. doi:10.1038/nature17164
- Liu X, El-Mahdy MA, Boslett J, Varadharaj S, Hemann C, Abdelghany TM, Ismail RS, Little SC, Zhou D, Thuy LT, Kawada N, Zweier JL (2017) Cytoglobin regulates blood pressure and vascular tone through nitric oxide metabolism in the vascular wall. *Nat Commun* 8:14807. doi:10.1038/ncomms14807
- Liu X, Follmer D, Zweier JR, Huang X, Hemann C, Liu K, Druhan LJ, Zweier JL (2012) Characterization of the function of cytoglobin as an oxygen-dependent regulator of nitric oxide concentration. *Biochemistry* 51 (25):5072-5082

- Lüdemann J, Verissimo KM, Dreger K, Fago A, Schneider I, Burmester T (2019) Globin E is a myoglobin-related, respiratory protein highly expressed in lungfish oocytes. *Scientific Reports* 9 (1):280
- Lushchak VI, Lushchak LP, Mota AA, Hermes-Lima M (2001) Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280 (1):R100-R107
- Lynch M, Conery JS (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290 (5494):1151-1155. doi:DOI 10.1126/science.290.5494.1151
- Lynch M, O'Hely M, Walsh B, Force A (2001) The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. *Genetics* 159 (4):1789-1804
- Macqueen DJ, Johnston IA (2014) A well-constrained estimate for the timing of the salmonid whole genome duplication reveals major decoupling from species diversification. *P Roy Soc B-Biol Sci* 281 (1778). doi:ARTN 20132881 10.1098/rspb.2013.2881
- Maeda N, Fitch W (1982) Isolation and amino acid sequence of a monomeric hemoglobin in heart muscle of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Journal of Biological Chemistry* 257 (6):2806-2815
- Magid AA (1967) Respiration of air by the primitive fish *Polypterus senegalus*. *Nature* 215 (5105):1096
- Mancini RA, Ramanathan R (2008) Sodium lactate influences myoglobin redox stability in vitro. *Meat Sci* 78 (4):529-532. doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.010
- Mangum (1985) Oxygen transport in invertebrate. *American Journal of Physiology-Regulatory* 248 (5):505-514
- Mangum CP (1992) Physiological Function of the Hemerythrins. In: Mangum CP (ed) *Blood and Tissue Oxygen Carriers*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 173-192. doi:10.1007/978-3-642-76418-9_7
- Markl J, Decker H (1992) Molecular Structure of the Arthropod Hemocyanins. In: Mangum CP (ed) *Blood and Tissue Oxygen Carriers*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 325-376. doi:10.1007/978-3-642-76418-9_12
- Martin A (2001) Is tetralogy true? Lack of support for the "one-to-four rule". *Molecular Biology and Evolution* 18 (1):89-93. doi:DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003723
- McLysaght A, Hokamp K, Wolfe KH (2002) Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat Genet* 31 (2):200-204. doi:10.1038/ng884
- McRonald FE, Liloglou T, Xinarianos G, Hill L, Rowbottom L, Langan JE, Ellis A, Shaw JM, Field JK, Risk JM (2006) Down-regulation of the cytoglobin gene, located on 17q25, in tylosis with oesophageal cancer (TOC): evidence for trans-allele repression. *Hum Mol Genet* 15 (8):1271-1277. doi:10.1093/hmg/ddl042
- Meeson AP, Radford N, Shelton JM, Mammen PPA, DiMaio JM, Hutcheson K, Kong YF, Elterman J, Williams RS, Garry DJ (2001) Adaptive mechanisms that preserve cardiac function in mice without myoglobin. *Circulation Research* 88 (7):713-720. doi:DOI 10.1161/hh0701.089753
- Meyer A (1998) Hox gene variation and evolution. *Nature* 391 (6664):225, 227-228. doi:10.1038/34530
- Meyer A, Schartl M (1999) Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol* 11 (6):699-704
- Mitz SA, Reuss S, Folkow LP, Blix AS, Ramirez JM, Hankeln T, Burmester T (2009) When the Brain Goes Diving: Glial Oxidative Metabolism May Confer Hypoxia Tolerance to the Seal Brain. *Neuroscience* 163 (2):552-560. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.06.058
- Montero-Pau J, Gómez A, Muñoz J (2008) Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods* 6 (6):218-222
- Montgomery J, Clements K (2000) Disaptation and recovery in the evolution of Antarctic fishes. *Trends Ecol Evol* 15 (7):267-271
- Moore RC, Purugganan MD (2003) The early stages of duplicate gene evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (26):15682-15687. doi:10.1073/pnas.2535513100
- Moore RC, Purugganan MD (2005) The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr Opin Plant Biol* 8 (2):122-128. doi:10.1016/j.pbi.2004.12.001
- Morrill GA, Kostellow AB (2016) Molecular properties of globin channels and pores: Role of cholesterol in ligand binding and movement. *Frontiers in physiology* 7:360
- Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, Schumacker PT (2011) Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Molecular and cellular biology* 31 (17):3531-3545
- Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y, Saeki S, Kim DH, Nakajima Y, Seki S, Kawada N, Yoshizato K (2004) Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab Invest* 84 (1):91-101. doi:10.1038/sj.labinvest.3700013
- Nikinmaa M (2002) Oxygen-dependent cellular functions—why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 133 (1):1-16

- Nikinmaa M, Rees BB (2005) Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288 (5):R1079-1090. doi:10.1152/ajpregu.00626.2004
- Nikolić M, Stanić D, Antonijević N, Niketić V (2004) Cholesterol bound to hemoglobin in normal human erythrocytes: a new form of cholesterol in circulation? *Clinical biochemistry* 37 (1):22-26
- Ober D (2005) Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci* 10 (9):444-449. doi:10.1016/j.tplants.2005.07.007
- Ohno S (1970) Evolution by gene duplication. Allen & Unwin; Springer-Verlag, London, New York,
- Ohno S, Wolf U, Atkin NB (1968) Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas* 59 (1):169-187
- Oleksiewicz U, Liloglou T, Field JK, Xinarianos G (2011) Cytoglobin: biochemical, functional and clinical perspective of the newest member of the globin family. *Cell Mol Life Sci* 68 (23):3869-3883. doi:10.1007/s00018-011-0764-9
- Oleksiewicz U, Liloglou T, Tasopoulou KM, Daskoulidou N, Bryan J, Gosney JR, Field JK, Xinarianos G (2013) Cytoglobin has bimodal: tumour suppressor and oncogene functions in lung cancer cell lines. *Hum Mol Genet* 22 (16):3207-3217. doi:10.1093/hmg/ddt174
- Opazo JC, Lee AP, Hoffmann FG, Toloza-Villalobos J, Burmester T, Venkatesh B, Storz JF (2015) Ancient Duplications and Expression Divergence in the Globin Gene Superfamily of Vertebrates: Insights from the Elephant Shark Genome and Transcriptome. *Mol Biol Evol* 32 (7):1684-1694. doi:10.1093/molbev/msv054
- Ormerod SJ, Dobson M, Hildrew AG, Townsend C (2010) Multiple stressors in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* 55:1-4
- Ortiz PA, Hong NJ, Garvin JL (2018) NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter activity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*
- Pace CM, Gibb AC (2011) Locomotor behavior across an environmental transition in the ropefish, *Erpetoichthys calabaricus*. *Journal of Experimental Biology* 214 (4):530-537
- Panopoulou G, Poustka AJ (2005) Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications -- the adventure of a hypothesis. *Trends Genet* 21 (10):559-567. doi:10.1016/j.tig.2005.08.004
- Patel VS, Cooper SJ, Deakin JE, Fulton B, Graves T, Warren WC, Wilson RK, Graves JA (2008) Platypus globin genes and flanking loci suggest a new insertional model for beta-globin evolution in birds and mammals. *BMC Biol* 6:34. doi:10.1186/1741-7007-6-34
- Patel VS, Ezaz T, Deakin JE, Graves JA (2010) Globin gene structure in a reptile supports the transpositional model for amniote alpha- and beta-globin gene evolution. *Chromosome Res* 18 (8):897-907. doi:10.1007/s10577-010-9164-5
- Pesce A, Bolognesi M, Bocedi A, Ascenzi P, Dewilde S, Moens L, Hankeln T, Burmester T (2002) Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep* 3 (12):1146-1151. doi:10.1093/embo-reports/kvf248
- Petersen MG, Dewilde S, Fago A (2008) Reactions of ferrous neuroglobin and cytoglobin with nitrite under anaerobic conditions. *Journal of inorganic biochemistry* 102 (9):1777-1782
- Pichersky E, Gang DR (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci* 5 (10):439-445
- Purves W, Sadava D, Held A, Markl J (2011) Purves biologie, 9. Aufl Spektrum Akademischer, Heidelberg Google Scholar
- Qi D, Chao Y, Zhao Y, Xia M, Wu R (2018) Molecular evolution of myoglobin in the Tibetan Plateau endemic schizothoracine fish (Cyprinidae, Teleostei) and tissue-specific expression changes under hypoxia. *Fish Physiol Biochem* 44 (2):557-571. doi:10.1007/s10695-017-0453-1
- Qiu Y, Sutton L, Riggs AF (1998) Identification of myoglobin in human smooth muscle. *J Biol Chem* 273 (36):23426-23432. doi:DOI 10.1074/jbc.273.36.23426
- Quinn NL, Boroevich KA, Lubieniecki KP, Chow W, Davidson EA, Phillips RB, Koop BF, Davidson WS (2010) Genomic organization and evolution of the Atlantic salmon hemoglobin repertoire. *Bmc Genomics* 11. doi:Artn 539 10.1186/1471-2164-11-539
- Raida Z, Hundahl CA, Nyengaard JR, Hay-Schmidt A (2013) Neuroglobin Over Expressing Mice: Expression Pattern and Effect on Brain Ischemic Infarct Size. *Plos One* 8 (10). doi:ARTN e76565 10.1371/journal.pone.0076565
- Rasmussen B, Fletcher IR, Brocks JJ, Kilburn MR (2008) Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 455 (7216):1101-1104. doi:10.1038/nature07381
- Rastogi S, Liberles DA (2005) Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *Bmc Evolutionary Biology* 5. doi:Artn 28 10.1186/1471/21-21-5-28
- Reeder BJ, Svistunenko DA, Wilson MT (2011) Lipid binding to cytoglobin leads to a change in haem co-ordination: a role for cytoglobin in lipid signalling of oxidative stress. *Biochem J* 434 (3):483-492. doi:10.1042/BJ20101136
- Rieger R (2014) Spezielle Zoologie. Teil 2: Wirbel-oder Schädeltiere. Springer-Verlag,
- Roesner A, Fuchs C, Hankeln T, Burmester T (2005) A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. *Mol Biol Evol* 22 (1):12-20. doi:10.1093/molbev/msh258

- Roesner A, Hankeln T, Burmester T (2006) Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol* 209 (Pt 11):2129-2137. doi:10.1242/jeb.02243
- Roesner A, Mitz SA, Hankeln T, Burmester T (2008) Globins and hypoxia adaptation in the goldfish, *Carassius auratus*. *FEBS J* 275 (14):3633-3643. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06508.x
- Roth C, Rastogi S, Arvestad L, Dittmar K, Light S, Ekman D, Liberles DA (2007) Evolution after gene duplication: models, mechanisms, sequences, systems, and organisms. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308 (1):58-73. doi:10.1002/jez.b.21124
- Sandrini JZ, Bianchini A, Trindade GS, Nery LEM, Marins LFF (2009) Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquatic toxicology* 95 (4):285-291
- Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson JC, Nevo E, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Hankeln T, Burmester T (2004) Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 279 (9):8063-8069. doi:10.1074/jbc.M310540200
- Schmidt M, Laufs T, Reuss S, Hankeln T, Burmester T (2005) Divergent distribution of cytoglobin and neuroglobin in the murine eye. *Neurosci Lett* 374 (3):207-211. doi:10.1016/j.neulet.2004.10.071
- Schneuer M, Flachsbarth S, Czech-Damal NU, Folkow LP, Siebert U, Burmester T (2012) Neuroglobin of Seals and Whales: Evidence for a Divergent Role in the Diving Brain. *Neuroscience* 223:35-44. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.07.052
- Schughart K, Kappen C, Ruddle FH (1989) Duplication of large genomic regions during the evolution of vertebrate homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (18):7067-7071
- Schwarze K, Burmester T (2013) Conservation of globin genes in the "living fossil" *Latimeria chalumnae* and reconstruction of the evolution of the vertebrate globin family. *Biochim Biophys Acta* 1834 (9):1801-1812. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.019
- Schwarze K, Campbell KL, Hankeln T, Storz JF, Hoffmann FG, Burmester T (2014) The globin gene repertoire of lampreys: convergent evolution of hemoglobin and myoglobin in jawed and jawless vertebrates. *Mol Biol Evol* 31 (10):2708-2721. doi:10.1093/molbev/msu216
- Schwarze K, Singh A, Burmester T (2015) The Full Globin Repertoire of Turtles Provides Insights into Vertebrate Globin Evolution and Functions. *Genome Biol Evol* 7 (7):1896-1913. doi:10.1093/gbe/evv114
- Shao B, Zhu L, Dong M, Wang J, Wang J, Xie H, Zhang Q, Du Z, Zhu S (2012) DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 21 (5):1533-1540
- Shaw RJ, Omar MM, Rokadiya S, Kogera FA, Lowe D, Hall GL, Woolgar JA, Homer J, Liloglou T, Field JK, Risk JM (2009) Cytoglobin is upregulated by tumour hypoxia and silenced by promoter hypermethylation in head and neck cancer. *Br J Cancer* 101 (1):139-144. doi:10.1038/sj.bjc.6605121
- Shivapurkar N, Stastny V, Okumura N, Girard L, Xie Y, Prinsen C, Thunnissen FB, Wistuba, II, Czerniak B, Frenkel E, Roth JA, Liloglou T, Xinarianos G, Field JK, Minna JD, Gazdar AF (2008) Cytoglobin, the newest member of the globin family, functions as a tumor suppressor gene. *Cancer Res* 68 (18):7448-7456. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0565
- Sidell BD, O'Brien KM (2006) When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes. *Journal of Experimental Biology* 209 (10):1791-1802. doi:10.1242/jeb.02091
- Sidow A (1996) Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 6 (6):715-722
- Singh S, Canseco DC, Manda SM, Shelton JM, Chirumamilla RR, Goetsch SC, Ye Q, Gerard RD, Schneider JW, Richardson JA, Rothermel BA, Mammen PP (2014) Cytoglobin modulates myogenic progenitor cell viability and muscle regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (1):E129-138. doi:10.1073/pnas.1314962111
- Smith JJ, Keinath MC (2015) The sea lamprey meiotic map improves resolution of ancient vertebrate genome duplications. *Genome Res* 25 (8):1081-1090. doi:10.1101/gr.184135.114
- Smith JJ, Kuraku S, Holt C, Sauka-Spengler T, Jiang N, Campbell MS, Yandell MD, Manousaki T, Meyer A, Bloom OE, Morgan JR, Buxbaum JD, Sachidanandam R, Sims C, Garruss AS, Cook M, Krumlauf R, Wiedemann LM, Sower SA, Decatur WA, Hall JA, Amemiya CT, Saha NR, Buckley KM, Rast JP et al. (2013) Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nat Genet* 45 (4):415-421, 421e411-412. doi:10.1038/ng.2568
- Solnica-Krezel L, Driever W (1994) Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly. *Development* 120 (9):2443-2455
- Song Z, Zhang X, Jia S, Yelick PC, Zhao C (2016) Zebrafish as a model for human ciliopathies. *Journal of Genetics and Genomics* 43 (3):107-120
- Sriram R, Kreutzer U, Shih L, Jue T (2008) Interaction of fatty acid with myoglobin. *FEBS letters* 582 (25-26):3643-3649
- Standen EM, Du TY, Larsson HC (2014) Developmental plasticity and the origin of tetrapods. *Nature* 513 (7516):54
- Stoltzfus A (1999) On the possibility of constructive neutral evolution. *J Mol Evol* 49 (2):169-181
- Storz JF, Opazo JC, Hoffmann FG (2011) Phylogenetic diversification of the globin gene superfamily in chordates. *IUBMB Life* 63 (5):313-322. doi:10.1002/iub.482

- Storz JF, Opazo JC, Hoffmann FG (2013) Gene duplication, genome duplication, and the functional diversification of vertebrate globins. *Mol Phylogenet Evol* 66 (2):469-478. doi:10.1016/j.ympev.2012.07.013
- Sun YJ, Jin KL, Mao XO, Zhu YH, Greenberg DA (2001) Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *P Natl Acad Sci USA* 98 (26):15306-15311. doi:DOI 10.1073/pnas.251466698
- Suzuki D, Brandley MC, Tokita M (2010) The mitochondrial phylogeny of an ancient lineage of ray-finned fishes (Polypteridae) with implications for the evolution of body elongation, pelvic fin loss, and craniofacial morphology in Osteichthyes. *BMC evolutionary biology* 10 (1):21
- Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS (2007) The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays* 29 (3):288-299
- Terwilliger NB (1998) Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J Exp Biol* 201 (Pt 8):1085-1098
- Thisse C, Thisse B (2008) High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature protocols* 3 (1):59
- Thuy Le TT, Hai NT, Hai H, Kawada N (2016a) Pathophysiological role of cytoglobin, the fourth globin in mammals, in liver diseases. *Histol Histopathol* 31 (3):257-267. doi:10.14670/HH-11-694
- Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N (2011) Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol* 179 (2):1050-1060. doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.006
- Thuy le TT, Van Thuy TT, Matsumoto Y, Hai H, Ikura Y, Yoshizato K, Kawada N (2016b) Absence of cytoglobin promotes multiple organ abnormalities in aged mice. *Sci Rep* 6:24990. doi:10.1038/srep24990
- Tiedke J, Cubuk C, Burmester T (2013) Environmental acidification triggers oxidative stress and enhances globin expression in zebrafish gills. *Biochem Biophys Res Commun* 441 (3):624-629. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.104
- Tiedke J, Gerlach F, Mitz SA, Hankeln T, Burmester T (2011) Ontogeny of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Physiol B* 181 (8):1011-1021. doi:10.1007/s00360-011-0588-9
- Tiso M, Tejero J, Basu S, Azarov I, Wang XD, Simplaceanu V, Frizzell S, Jayaraman T, Geary L, Shapiro C, Ho C, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT (2011) Human Neuroglobin Functions as a Redox-regulated Nitrite Reductase. *J Biol Chem* 286 (20):18277-18289. doi:10.1074/jbc.M110.159541
- Trent JT, 3rd, Hargrove MS (2002) A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem* 277 (22):19538-19545. doi:10.1074/jbc.M201934200
- Van de Peer Y, Maere S, Meyer A (2009) The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat Rev Genet* 10 (10):725-732. doi:10.1038/nrg2600
- Vazquez-Limon C, Hoogewijs D, Vinogradov SN, Arredondo-Peter R (2012) The evolution of land plant hemoglobins. *Plant Sci* 191-192:71-81. doi:10.1016/j.plantsci.2012.04.013
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291 (5507):1304-1351. doi:10.1126/science.1058040
- Vervoort A (1980) Tetraploidy in *Protopterus* (Dipnoi). *Experientia* 36 (3):294-296
- Villeneuve J-P, Pichette V (2004) Cytochrome P450 and liver diseases. *Current drug metabolism* 5 (3):273-282
- Vinogradov SN, Bailly X, Smith DR, Tinajero-Trejo M, Poole RK, Hoogewijs D (2013a) Microbial eukaryote globins. *Adv Microb Physiol* 63:391-446. doi:10.1016/B978-0-12-407693-8.00009-1
- Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Arredondo-Peter R, Gough J, Dewilde S, Moens L, Vanfleteren JR (2006) A phylogenomic profile of globins. *BMC Evol Biol* 6:31. doi:10.1186/1471-2148-6-31
- Vinogradov SN, Tinajero-Trejo M, Poole RK, Hoogewijs D (2013b) Bacterial and archaeal globins - a revised perspective. *Biochim Biophys Acta* 1834 (9):1789-1800. doi:10.1016/j.bbapap.2013.03.021
- Walsh JB (1995) How Often Do Duplicated Genes Evolve New Functions. *Genetics* 139 (1):421-428
- Wangensteen R, Rodríguez-Gomez I, Moreno JM, Vargas F, Álvarez-Guerra M (2006) Chronic nitric oxide blockade modulates renal Na-K-2Cl cotransporters. *Journal of hypertension* 24 (12):2451-2458
- Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT (2002) Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circulation research* 91 (8):719-726
- Weber RE, Vinogradov SN (2001) Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol Rev* 81 (2):569-628. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.569
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome biology* 1 (6):reviews3003. 3001
- Wilkinson RN, Elworthy S, Ingham PW, van Eeden FJ (2013) A method for high-throughput PCR-based genotyping of larval zebrafish tail biopsies. *Biotechniques* 55 (6):314-316. doi:10.2144/000114116
- Wittenberg BA, Wittenberg JB (1989) Transport of oxygen in muscle. *Annu Rev Physiol* 51:857-878. doi:10.1146/annurev.ph.51.030189.004233
- Wittenberg JB (2003) Myoglobin function reassessed. *Journal of Experimental Biology* 206 (12):2011-2020. doi:10.1242/jeb.00243

- Wolfe KH (2001) Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat Rev Genet* 2 (5):333-341. doi:10.1038/35072009
- Wolfe KH, Li WH (2003) Molecular evolution meets the genomics revolution. *Nat Genet* 33 Suppl:255-265. doi:10.1038/ng1088
- Wystub S, Ebner B, Fuchs C, Weich B, Burmester T, Hankeln T (2004) Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenet Genome Res* 105 (1):65-78. doi:10.1159/000078011
- Xi Y, Obara M, Ishida Y, Ikeda S, Yoshizato K (2007) Gene expression and tissue distribution of cytoglobin and myoglobin in the Amphibia and Reptilia: possible compensation of myoglobin with cytoglobin in skeletal muscle cells of anurans that lack the myoglobin gene. *Gene* 398 (1-2):94-102. doi:10.1016/j.gene.2007.01.040
- Xinarianos G, McDonald FE, Risk JM, Bowers NL, Nikolaidis G, Field JK, Liloglou T (2006) Frequent genetic and epigenetic abnormalities contribute to the deregulation of cytoglobin in non-small cell lung cancer. *Hum Mol Genet* 15 (13):2038-2044. doi:10.1093/hmg/ddl128
- Xu R, Harrison PM, Chen M, Li L, Tsui TY, Fung PC, Cheung PT, Wang G, Li H, Diao Y, Krissansen GW, Xu S, Farzaneh F (2006) Cytoglobin overexpression protects against damage-induced fibrosis. *Mol Ther* 13 (6):1093-1100. doi:10.1016/j.ymthe.2005.11.027
- Zhang JZ (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol* 18 (6):292-298. doi:10.1016/S0169-5347(03)00033-8
- Zhao C, Wan L, Jiang L, Wang Q, Jiao K (2008) Highly sensitive and selective cholesterol biosensor based on direct electron transfer of hemoglobin. *Analytical biochemistry* 383 (1):25-30
- Zhao L, Chen X-J, Zhu J, Xi Y-B, Yang X, Hu L-D, Ouyang H, Patel SH, Jin X, Lin D (2015) Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature* 523 (7562):607
- Zhu X, Xu Y, Yu S, Lu L, Ding M, Cheng J, Song G, Gao X, Yao L, Fan D, Meng S, Zhang X, Hu S, Tian Y (2014) An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 4:6420. doi:10.1038/srep06420

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
3'(5')	Ende des Nukleinsäurestranges
α	alpha, anti
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Adgb	Androglobin
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bzw.	beziehungsweise
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlstoffdioxid
Cygb	Cytoglobin
<i>Cygb1</i>	Cytoglobin 1
<i>Cygb2</i>	Cytoglobin 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpf	<i>days post fertilization</i>
Dre	<i>Danio rerio</i> , Zebrafisch
Eca	<i>Erpetoichthys calabaricus</i> , Flösselaal
<i>et al.</i>	und andere
GbE	Globin E
GbX	Globin X
GbY	Globin Y
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
hpf	<i>hours post fertilization</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung
KO	Knockout
LB	lysogeny broth, Nährmedium
Mb	Myoglobin
mM	Millimolar
mpf	<i>months post fertilization</i>
NaCl	Natriumchlorid
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
Ngb	Neuroglobin
Ni	Nickel
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ -	Nitrit

NO ₃ -	Nitrat
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
P ₅₀	Halbsättigungsdruck
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pan	<i>Protopterus annectens</i> , Westafrikanischer Lungenfisch
PBS	Phosphate buffered saline
Pca	<i>Physeter catodon</i> , Pottwal
PE	Paired End
Pse	<i>Polypterus senegalus</i> , Senegal-Flösselhecht
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Reverse Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPKM	<i>Reads per kilobase of exon model per million mapped Reads</i>
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>Rotations per Minute</i>)
RT	Raumtemperatur
ssWGD	Lachsartig-spezifische Genomduplikation (engl. <i>salmonid-specific whole genome duplication</i>)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SRA	Sequence Read Archive
Tab.	Tabelle
tsWGD	Teleost-spezifische Genomduplikation (engl. <i>Teleost-specific-genome-duplication</i>)
U	Units
u.a.	unter Anderem
V	Volt
VE-H ₂ O	Vollentmineralisiertes Wasser
WGD	Gesamtgenomduplikation (engl. <i>whole genome duplication</i>)
w/v	Weight/Volumen
WT	Wildtyp
x g	x Fache der Erdbeschleunigung (g)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Anhang

Anhang Tabelle 1 Übersicht der verwendeten SRA-Datensätze

Spezies	Gewebe	SRA-ID	Länge der Reads
<i>Coilia nasus</i> (Cna)	Gehirn	SRR1406754	100 PE
	Leber	SRR1406760	100 PE
Cavefish (Ame)	Gehirn	SRR2045427	100 PE
	Leber	SRR2045431	100 PE
	Herz	SRR2045429	100 PE
	Kiemen	SRR2045428	100 PE
	Testis	SRR2045435	100 PE
	Ovarien	SRR2045426	100 PE
Weißstirn-Messerfisch (Aal)	Gehirn	SRR1532748	100 PE
	Leber	SRR1532751	100 PE
	Herz	SRR1532749	100 PE
	Testis	SRR1532755	100 PE
	Ovarien	SRR1532747	100 PE
Pangasius (Phy)	Gehirn	SRR1533641	100 PE
	Leber	SRR1533645	100 PE
	Herz	SRR1533643	100 PE
	Kiemen	SRR1719651	114 SE
	Testis	SRR1533649	100 PE
	Ovarien	SRR1533640	100 PE
Dreistachliger Stichling (Gac)	Gehirn	SRR5420700	76 PE
	Leber	SRR5420694	76 PE
Barramundi (Lca)	Gehirn	SRR1791593	100 PE
	Leber	SRR2179937	150 PE
	Testis	SRR1791598	100 PE
	Ovarien	SRR1791597	100 PE
<i>Astatotilapia calliptera</i> (Aca)	Gehirn	ERR1950115	75 PE
	Leber	ERR1953016	75 PE
Seepferdchen (Her)	Gehirn	SRR3289251	90 PE
Hecht (Elu)	Gehirn	SRR1228710	100 PE
	Leber	SRR1228725	100 PE
	Herz	SRR1228723	100 PE
	Kiemen	SRR1533653	100 PE
	Testis	SRR1533661	100 PE
	Ovarien	SRR1533651	100 PE
Regenbogenforelle (Omy)	Gehirn	SRR5373270	126 PE
	Leber	SRR5373283	126 PE
	Herz	ERR324379	100 SE
	Kiemen	SRR1047496	36 SE
	Testis	SRR5657606	100 PE
	Ovarien	ERR324375	100 SE
Atlantischer Lachs (Ssa)	Gehirn	SRR1422856	100 PE
	Leber	SRR7184464	222 PE
	Herz	SRR1422862	100 PE
	Kiemen	SRR7184468	222 PE
	Testis	SRR1422872	100 PE
	Ovarien	SRR1422871	100 PE
Ayu (Pal)	Gehirn	SRR1533708	100 PE
	Leber	SRR1533712	100 PE
	Herz	SRR1533710	100 PE
	Kiemen	SRR1533709	100 PE
	Testis	SRR1533716	100 PE
	Ovarien	SRR1533707	100 PE
Kabeljau (Gmo)	Gehirn	SRR2045416	100 PE

Anhang

	Leber	SRR2045420	100 PE
	Herz	SRR2045418	100 PE
	Kiemen	SRR2045417	100 PE
	Testis	SRR2045424	100 PE
	Ovarien	SRR2045415	100 PE
Zebrafisch (Dre)	Gehirn	SRR4026140	100 PE
	Leber	SRR3624458	51 PE
	Herz	SRR6308291	100 PE
	Kiemen	SRR1524239	100 PE
	Testis	SRR1695730	100 PE
	Ovarien	SRR1524248	100 PE
Senegal-Flösselhecht (Pse)	Mixtur	SRR1612395	90 PE
	Kieferknochen	SRR5114773	51 PE
	Brustflosse 14 dpa	SRR2826833	76 PE
Flösselaal (Eca)	Mixtur	SRR3293426	90 PE
	Kiemen	SRR3293424	90 PE
	Leber	SRR3293425	90 PE

> *Dre_Cygb1*: 3' UTR NCBI Reference Sequence: NM_152952.1

3`...ATTAGACCGTTAGCATTTCACTAAAAAGAAAAAAAAAAAAAGAAAAAACGTTTTTGATGAATTTTCTATTTAAAG
CTTGAGTCTGCTGTAGTTACATCGTGAAATGAACCAGACAAAAATGACAAATGACTAGCTTCTAGGCCAAAATT
AGTTTCTAGGCCAAAATGTGTCATTTTTAAGAGTTATTTTGTGTTTTGCTAATTTTTAGCATTTCGTTAACATTTTC
GCTCAAAAAGAAAAAAAAAGGTTTTGATGATTTTTCTGGCAACGCAGTGGCGCAGTAGGTAGCGCTGCCGCCCCA
CAGCAAGAAGGCCACCGGCTCGAGCCCCGTCTGGCTCAGTTGCCGCCTCTGTGTGGAGTTGCATGTTCTCCCCA
CGTTCGCATGGGTTTCTCCGGGTGCCCTGGTTACCGCACAGTCCAAAGACATGTGGTACAGGTGAACTGGGTA
GGCCAAACTATCCGCAGTGCATGAGTGTGATG...5`

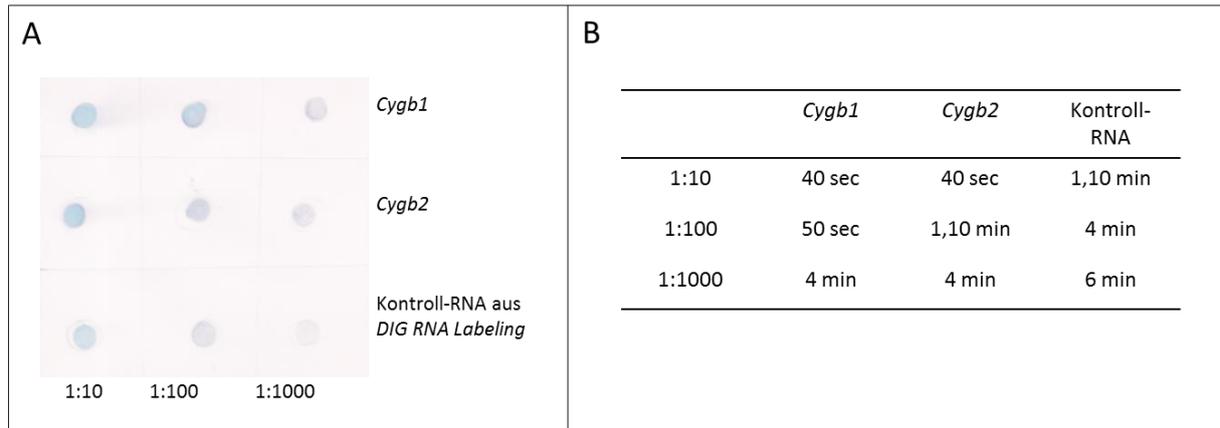
> *Dre_Cygb2*: 3' UTR NCBI Reference Sequence: NM_001024224.1

3`...TACTTGAAGGCTATAGAGTTGAGATTAAGTAAGTACACAATACTAACCTTAAAATTCACAATAGCACATTATA
CGTGGCATAGACAACATCTGAAAAGTCAGTATATACTATACTGAGTTATTATGTATAAAACAGGGTACAAGAG
AATGACACATTTGATGATGAACAGATTTACGCCCTACTTCTTTCATAATTATTTCTTTTACCTTTTCATCTTACATCA
ATTGTTTAGCTAGCCAAACTTATTGATCACAGCCAGTGTATCTTATGTGTGTTGATTGTGAATGTGCCAGGCCTTC
TCAGACTGCTGAGCTGGATAGTTTGACC...5`

Primer forward: blau

Primer reverse: rot

Anhang Abbildung 1 Sequenzen der *Cygb1*- und *Cygb2*-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung



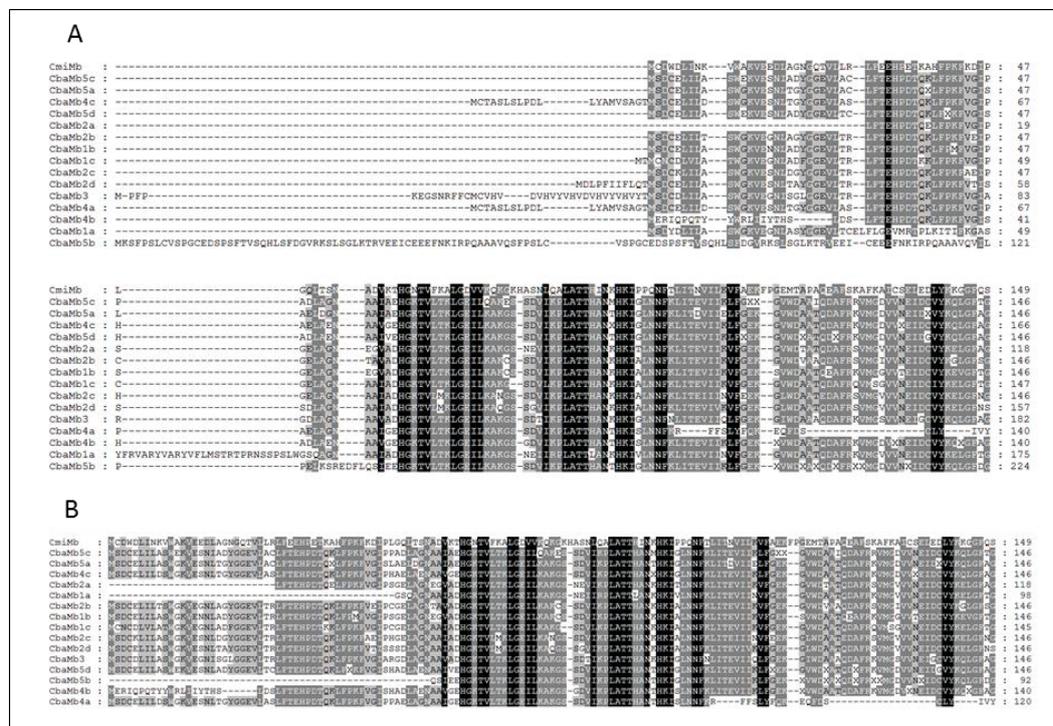
Anhang Abbildung 2 (A) Dot Blot für die *Cygb1*- und *Cygb2*-Sonden, (B) gemessene Reaktionszeiten der Sonden auf einem Dot Blot

Anhang Tabelle 2 SRA-Sequenzen von Neuronen und Gliazellen

Zelltypen	Quelle
Olfaktorische sensorische Neurone, 5 dpf	cell sorting GFP (+), SRR1049948
Spinal-Neurone, 20 hpf	gal4 driver HuC, SRR1616929
Intestinal-Neurone, 7 dpf	cell sorting GFP (+), SRR6231894
Neuronale Vorläuferzellen, 3 mpf	cell sorting GFP (+), SRR6829425
Müller-Gliazellen	cell sorting GFP (+), SRR4241538
Micro-Gliazellen	cell sorting GFP (+), SRR4242440
Radial-Gliazellen, 7 dpf	cell sorting GFP (+), SRR6829411
Radial-Gliazellen, 3 mpf	cell sorting GFP (+), SRR6829422

Anhang Tabelle 3 Übersicht der der reads und gemapten reads der eigens generierten Transkriptome

Fish-ID	Sequenzen in pairs	Sequenzen in pairs nach dem Trimming	Reads mapped in pairs [%]	Mapped to Gene [%]
F1-KO-Gehirn-N	44.824.094	44.823.304	85,59	86,23
F1-KO-Leber-N	42.675.806	42.675.062	87,54	95,41
F1-WT-Gehirn-H	41.027.716	41.026.772	82,44	82,44
F1-WT-Leber-H	44.292.710	44.291.900	86,64	95,19
F3-KO-Gehirn-H	37.290.702	37.289.910	83,85	86,09
F3-KO-Leber-H	42.345.718	42.344.922	87,11	95,00
F4-KO-Gehirn-H	45.637.258	45.636.370	83,88	86,17
F4-KO-Gehirn-N	41.981.820	41.981.050	84,46	86,32
F4-KO-Leber-H	40.946.856	40.946.182	87,39	95,33
F4-KO-Leber-N	43.846.764	43.846.070	89,60	98,02
F5-KO-Gehirn-H	32.092.286	32.091.658	83,17	86,55
F5-KO-Leber-H	35.549.494	35.548.732	86,00	95,84
F5-WT-Gehirn-N	45.607.036	45.606.190	84,91	86,85
F5-WT-Leber-N	43.574.672	43.573.448	84,38	95,53
F6-WT-Gehirn-H	46.597.020	46.595.924	79,43	86,77
F6-WT-Gehirn-N	36.866.040	36.865.284	83,12	86,13
F6-WT-Leber-H	32.373.868	32.373.094	81,86	95,34
F6-WT-Leber-N	40.328.552	40.327.768	85,73	95,14
F7-WT-Gehirn-H	40.337.920	40.337.036	82,45	87,23
F7-WT-Gehirn-N	43.842.798	43.841.936	84,38	86,64
F7-WT-Leber-H	43.018.080	43.017.264	86,40	95,70
F7-WT-Leber-N	40.576.862	40.576.154	86,06	94,82
F8-KO-Gehirn-N	43.402.782	43.401.672	82,42	86,77
F8-KO-Leber-N	43.278.526	43.277.722	87,54	95,03
Mittelwerte	41.346.474	41.345.643	84,85	90,86



Anhang Abbildung 3 Übersicht der multiplen Mb-Gene des Froschwesels

(A) Dargestellt sind die vollständigen Mb-Gene des Froschwesels im Vergleich zu der single copy Mb-Sequenz der Australischen Pflughasenchimäre. (B) Dargestellt sind die getrimmten Mb-Sequenzen des Froschwesels im Vergleich zu der single copy Mb-Sequenz der Australischen Pflughasenchimäre.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem Speichermedium.

Hamburg, September 2019

Kathrin Helfenrath

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Thorsten Burmester bedanken, der mir dieses spannende Forschungsthema für meine Doktorarbeit bereitgestellt hat. Ich danke dir für dein Vertrauen und für deine Unterstützung.

Ein besonderes Dankeschön gebührt Dr. Andrej Fabrizius, der mir als Betreuer jederzeit zur Seite stand. Ich danke dir für deine Unterstützung, für deine Ratschläge und für deine Hilfsbereitschaft. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer vorstellen können. Danke!

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Susanne Dobler bedanken, die sich dazu bereit erklärt hat, das Erstgutachten für diese Arbeit anzufertigen. Vielen Dank dafür.

Für die tolle Unterstützung im Labor möchte ich mich bei Michelle Wisniewsky, Maria Machola, Katja Reimann und Marilou Kloock bedanken. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr hattet und für jedes Problem eine Lösung herbeizaubern konntet. Besonders möchte ich mich bei Michelle für die tatkräftige Unterstützung bei verschiedenen Experimenten im Labor bedanken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die tolle Zeit, für die vielen leckeren Kuchenpartys und die tollen Grillabende bedanken. Vielen Dank an Julia, Elsa, Annette, Conny, Alena, Paressa und Gerrit für die tollen Mittagspausen, Kaffeepausen und für die schöne Zeit in unserem herrlichen Büro.

Ich möchte mich auch bei Toni, Isa, Birte, Katha, Nathalie und Nicola bedanken, mit denen ich das gesamte Studium gemeistert habe. Ihr habt diese Zeit für mich unvergesslich gemacht.

Meiner Familie danke ich für die immerwährende Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt! Ich möchte mich besonders bei meinen Großeltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei David bedanken. Ich danke dir dafür, dass du immer an meiner Seite bist und all meine Idee unterstützt. Danke, dass du während meiner Doktorarbeit die gelegentlich anfallenden kleinen Stimmungsschwankungen aufgefangen hast und es immer wieder schaffst, sie in ein Lächeln umzuwandeln.