

Diplomarbeit im Fach Biologie,
Fachbereich 2 der Universität Bremen
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven

**Auswirkung von Hypoxie
auf die Islandmuschel *Arctica islandica*:
Untersuchungen zum zellulären Redoxpotential
und Vorarbeiten für die Messung Hypoxie-
induzierter Genexpression**



vorgelegt von

Ellen Weihe

Bremen, September 2005

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
HÄUFIG BENUTZTE ABKÜRZUNGEN	5
ZUSAMMENFASSUNG	7
1. EINLEITUNG	8
1.1. SAUERSTOFFVERHÄLTNISSE IN DER OSTSEE	8
1.2. STOFFWECHSEL UNTER HYPOXIE	9
1.3. OXIDATIVER STRESS	10
1.4. GLUTATHION	11
1.5. HIF-1 HYPOXIE INDUZIERBARER FAKTOR	12
1.6. <i>ARCTICA ISLANDICA</i>	14
1.7. FRAGESTELLUNG	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. TIERHÄLTERUNG UND VERSUCHSAUFBAU	17
2.1.1. <i>Tierbeschaffung und -haltung</i>	17
2.1.2. <i>Hypoxie-Inkubation</i>	17
2.1.3. <i>Probennahme</i>	18
2.2. MESSUNG DER GLUTATHIONKONZENTRATION UND DES REDOXPOTENTIALS IM GEWEBE	19
2.2.1. <i>Messung des intrazellulären pH-Wertes (pHi), nach Pörtner et al. (1990)</i>	19
2.2.2. <i>Glutathion-Bestimmung nach Farris & Reed (1987)</i>	20
2.2.3. <i>Berechnung der Ergebnisse</i>	21
2.2.4. <i>Statistik</i>	21
2.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	22
2.3.1. <i>Vorbereitungen für das Arbeiten mit RNA</i>	22
2.3.2. <i>RNA-Isolierung</i>	22
2.3.3. <i>DNA-Verdau</i>	23
2.3.4. <i>RNA-Reinigung</i>	23
2.3.5. <i>Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA</i>	24
2.3.6. <i>Herstellung spezifischer Starteroligonukleotide (Primer)</i>	25
2.3.7. <i>Reverse Transkription</i>	26
2.3.8. <i>Amplifizierung von cDNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction)</i>	27
2.3.9. <i>Agarosegel</i>	29
2.3.10. <i>DNA-Isolierung aus dem Gel</i>	30
2.3.11. <i>Klonierung, Plasmid-Isolation und Sequenzierung</i>	30
2.3.12. <i>Computergestützte Sequenzanalyse</i>	31

3. ERGEBNISSE	32
3.1. PHI-WERTE IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEN UNTER HYPOXIE	32
3.2. GLUTATHIONKONZENTRATION UND REDOXPOTENTIAL IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEN DER ISLANDMUSCHEL UNTER HYPOXIE	33
3.3. VERGLEICH ZWISCHEN DEN GEWEBEN MITTELDARMDRÜSE, KIEME UND MANTEL BEZÜGLICH DES GLUTATHIONGEHALTES UND DES REDOXPOTENTIALS	38
3.4. RNA-ISOLATION	39
3.5. REFERENZSONDEN	42
3.5.1. 18S rRNA.....	43
3.5.2. Actin	44
3.5.3. HIF.....	46
4. DISKUSSION	47
4.1. AUSWIRKUNG VON HYPOXIE AUF <i>A. ISLANDICA</i>	47
4.1.1. Warum wurde <i>A. islandica</i> unter Hypoxie untersucht?.....	47
4.1.2. Vergleich der verschiedenen Gewebe Mitteldarmdrüse, Kieme und Mantel von <i>A. islandica</i> unter normoxen Kontrollbedingungen	48
4.1.2.1. Intrazellulärer pH-Wert (pHi)	48
4.1.2.2. Das Glutathion-System	48
4.1.2.3. Hypoxie-Antwort von <i>A. islandica</i>	50
4.1.2.3.1. Der intrazelluläre pH-Wert (pHi) als Indikator für Anaerobiose	50
4.1.2.3.2. Das Glutathion-System als Indikator für antioxidative Kapazität und intrazelluläres Redox- Potential.....	51
4.1.2.3.3. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 als Indikator für Sauerstoff-abhängige Genexpression ...	53
4.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE VORARBEITEN FÜR DIE MESSUNG HYPOXIE-INDUZIERTER GENEXPRESSION	54
4.2.1. Vergleich der <i>A. islandica</i> Actin-Sequenzen mit denen anderer Muschelarten.....	55
4.2.2. Vergleich der <i>A. islandica</i> 18S rRNA-Sequenz mit denen anderer Muschelarten.....	55
4.2.3. Mögliche Gründe, weshalb bisher keine Sequenz-Bestimmung von HIF-1 α möglich war.	56
4.3. ABSCHLUSSBETRACHTUNG UND AUSBLICK	57
5. LITERATUR.....	58
6. ANHANG	64
DANKSAGUNG	72
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	73

Häufig benutzte Abkürzungen

<i>Ai</i>	<i>Arctica islandica</i>
B im Primer	backward
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaare
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	komplementäre DNA
<i>Cg</i>	<i>Crassostera gigas</i>
<i>Cv</i>	<i>Crassostera virginica</i>
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>Dp</i>	<i>Dreissena polymorpha</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
F im Primer	forward
FG	Frischgewicht
<i>Gh</i>	<i>Glossus humanus</i>
<i>Gm</i>	<i>Gadus morhua</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HPLC	high performance liquid chromatography
kb	Kilobasen
kPa	Kilopascal
<i>Ma</i>	<i>Mya arenaria</i>
Mact	Muschel-Actin
<i>Mg</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
MOPS	N-Morpholino-Propan-Sulfonsäure
MW	Mittelwert
OD	optische Dichte
ODD	Sauerstoff-abhängige Degradierungs Domäne (oxygen-dependent degradation domain)
p.A.	pro analyses; für Analyse
PAS	Per/Arnt/Sim

PCR	Polymerase Kettenreaktion
pHi	intrazellulärer pH
<i>Pm</i>	<i>Pecten maximus</i>
PO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
STF	Standardfehler
TAD	Transaktivierungs Domäne

Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit untersuchte Population der Islandmuschel *Arctica islandica* lebt in weichen Sedimentböden der Ostsee, wo in Sommermonaten der Sauerstoffgehalt im Bodenwasser stark absinken kann. Im Rahmen von Untersuchungen zu diesen Extremereignissen hat sich gezeigt, dass *A. islandica* eine besonders hohe Hypoxietoleranz besitzt. Sie kann bis zu 62,5 Tage ohne Sauerstoff überleben.

In dieser Diplomarbeit sollte untersucht werden, ob bei *A. islandica* Hypoxie zu einer Veränderung des Redoxpotentials führt, ob also antioxidative Schutzmechanismen induziert werden.

Um diese Fragen zu untersuchen wurden die Tiere bis zu einer Woche bei schwerer Hypoxie (1-2% O₂) inkubiert. Der Glutathiongehalt wurde als Marker für die antioxidative Kapazität und das Redoxpotential in dem Kiemen-, Mantel- und Mitteldarmdrüsen Gewebe bestimmt. Für die Berechnung des Redoxpotentials wurde außerdem der intrazelluläre pH-Wert in den Geweben gemessen. Dieser gibt zusätzlich Auskunft, ob die Tiere bereits in eine Anaerobiose übergegangen sind.

Darüber hinaus sollte der Transkriptionsfaktor HIF, der über Veränderung der Genexpression bei Hypoxie-sensitiven Tieren das Überleben unter Sauerstoffmangel ermöglicht, in der Hypoxie-toleranten Islandmuschel nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen haben auch nach fünftägiger Hypoxie-Inkubation keine Veränderung des pH_i gegenüber den Kontrollen ergeben. Das heißt, dass die Tiere nicht in eine Anaerobiose übergegangen sind. Dementsprechend werden sie die Strategie der Stoffwechsel- und Energieumsatzreduktion verfolgen. Dafür spricht auch die Abnahme des Glutathiongehaltes in der Mitteldarmdrüse. Es konnte also kein Anstieg der antioxidativen Kapazität über das Glutathion festgestellt werden. Es ist aber denkbar, dass andere Antioxidantien oder antioxidative Enzyme in den Zellen zu diesem Zweck gebildet wurden. Es wäre interessant diese in späteren Arbeiten zu messen, um herauszufinden, welche Wege *A. islandica* geht, um die antioxidative Kapazität aufrechtzuerhalten. Des Weiteren konnte ein Anstieg des Redoxpotentials in der Mitteldarmdrüse beobachtet werden, der vermutlich auf eine reduzierte Glutathionreduktase-Aktivität zurückgeführt werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Voruntersuchungen zur Optimierung der RNA-Isolierung aus dem Gewebe der Islandmuschel *A. islandica* konnten erfolgreich abgeschlossen werden. So konnte ein Fragment des Actins und der 18S rRNA isoliert werden, die für zukünftige Genexpressionsstudien als Referenzsonden dienen können. Der Nachweis von HIF und seiner Funktion in *A. islandica* muss in weiteren Projekten bearbeitet werden.

1. Einleitung

1.1. Sauerstoffverhältnisse in der Ostsee

Im Respiationsmedium Wasser liegt Sauerstoff (O_2) in einer viel geringeren Volumenkonzentration vor als in der Luft. Im Wasser (bei 15 °C) sind nur 7 ml O_2 pro Liter gelöst. Demnach besitzt Luft bei 15 °C einen 30fach höheren O_2 -Gehalt als Wasser (210 ml, Wehner & Gehring, 1995). Obwohl der O_2 -Gehalt in der bodennahen Wasserschicht zudem noch deutlich unterhalb der Sättigungskonzentration liegen kann (z.B. wenn es durch anaerobe Prozesse im Sediment zu einer erhöhten chemischen Sauerstoffzehrung kommt), reicht er den dort lebenden Organismen meist noch aus, um ihren niedrigen Bedarf zu decken (Storey, 1996). Fällt die O_2 -Konzentration jedoch unter einen kritischen Wert von 2 ml/L O_2 im Wasser spricht man von Hypoxie (Diaz & Rosenberg, 1995). Die meisten marinen Tiere können unter diesen Bedingungen nicht mehr die volle aerobe Leistungskapazität erbringen.

Mit der zunehmenden Eutrophierung der Meere weiten sich Häufigkeit und Stärke der Hypoxie-Ereignisse aus. Durch verstärkten Nährstoffeintrag kann es zu besonders dichten Algenblüten kommen. Sinkt das abgestorbene organische Material zu Boden, wird es dort von Mikroorganismen unter O_2 -Verbrauch abgebaut, wodurch es im Bodenbereich zu Sauerstoffmangel kommt. Dies ist besonders dann der Fall, wenn durch starke Schichtung keine Durchmischung des Bodenwassers mit O_2 -reichem Oberflächenwasser stattfindet.

Die Ostsee hat eine ganzjährige Salinitätsschichtung (Halokline), zu der in den Sommermonaten eine Temperaturschichtung (Thermokline) hinzukommt. Diese Schichten werden nur im Winter durch starke Stürme und eine starke Abkühlung der Oberflächenschicht durchmischt (durch Absinken des kalten Oberflächenwassers). Die Hauptlieferung von Sauerstoff in die tieferen Gebiete der westlichen Ostsee erfolgt durch den von Westwind angetriebenen Salzwassereinstrom aus dem Kattegat (Gerlach, 1994). Wenn dieser Wasseraustausch im Frühjahr und Sommer nicht ausreichend erfolgt und in warmen Jahren das Wasser in den Rinnensystemen der westlichen Ostsee stagniert, kommt es zur völligen Zehrung des bodennahen Sauerstoffs.

So führte die Kombination von erhöhten Nährstoffeinträgen und unzureichender Durchmischung der Wasserschichten in den 80er und 90er Jahren zu ausgedehntem Sauerstoffmangel in der westlichen Ostsee einschließlich der Kieler Bucht (Gerlach, 1986; Diaz & Rosenberg, 1995). Nach solchen mehrere Wochen anhaltenden

Sauerstoffmangel-Perioden wurde eine starke Veränderung der Bodenfauna beobachtet. Viele Tierarten waren in diesen Gebieten nicht mehr vorhanden oder stark dezimiert. Einige wenige Arten, darunter die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Islandmuschel, *Arctica islandica*, schienen wenig beeinflusst von den Hypoxie-Ereignissen. Sie wurden in unveränderten Besiedlungsdichten vorgefunden (Diaz & Rosenberg, 1995). Tatsächlich besitzt *Arctica islandica* ausgeprägte Anoxietoleranz. Die Tiere können bei 10 °C bis zu 1500 Stunden (62,5 Tage) ohne Sauerstoff auskommen (Theede, 1973). Dieser Zeitraum wurde allerdings experimentell ermittelt und ist darüber hinaus abhängig von der Temperatur und der Schwefelwasserstoffkonzentration (hohe Temperatur und hohe H₂S-Konzentration verkürzen die Überlebenszeit).

Selbst unter vollkommen oxischen Verhältnissen dringt Sauerstoff nur wenige Millimeter ins Sediment ein (Hylleberg & Riis-Vestergaard, 1984). Die Eindringtiefe hängt vom O₂-Gehalt im bodennahen Wasserkörper und der Strömungsgeschwindigkeit an der Sediment-Wasser-Grenzfläche ab. Größere Körnung, wie Sand sie hat, und gleichmäßige Sortierung führen zu einem größeren Interstitialraum und damit zur besseren Durchlüftung der Sedimentoberfläche. Kurzfristige Änderungen ergeben sich durch die Eintragsrate an organischem Material (sowohl durch Horizontaltransport als auch Sedimentation), die Bioturbationsintensität (Durchmischung der Sedimentschichten durch die im Sediment lebende Makrofauna) und die Temperatur (Hylleberg & Riis-Vestergaard, 1984; Diaz & Rosenberg, 1995: hohe Temperaturen führen zu verstärktem mikrobiellen Sauerstoffbedarf). Viele Benthosorganismen der Ostsee, wie die im vorliegenden Projekt untersuchte *A. islandica* aus der Ostsee, sind sehr gut für das Überleben unter Sauerstoffmangelbedingungen angepasst.

1.2. Stoffwechsel unter Hypoxie

Eine der wichtigsten Strategien der Anpassung bei Hypoxie-toleranten Tieren besteht in einer sauerstoffabhängigen Reduktion des Stoffwechsels. Eine Einsparung im ATP-Umsatz führt zu einer Reduktion des Aktivitätslevels und des Wachstums. Dieser verringerte ATP-Umsatz bewirkt, dass eine Sauerstoffschuld und damit eine Ansäuerung der Gewebe zunächst vermieden wird. Marine Wirbellose können darüber hinaus über mitochondriale Stoffwechselwege (Embden-Meyerhof-Weg) anaerob Energie bereitstellen. Dabei entstehen Metabolite wie Succinat, Alanin, Propionat und Acetat, und es können 7 ATP über den Succinat-Propionat-Weg pro Glukoseeinheit

gewonnen werden. Über den Laktatstoffwechsel werden dagegen lediglich 2 ATP pro Glukoseeinheit gebildet (Grieshaber et al., 1994).

Unter Hypoxie kann es durch die Anreicherung kurzkettiger organischer Säuren und Aminosäuren (wie Alanin) zu einer Ansäuerung des Gewebes kommen. Organische Säuren, die Endprodukte der Gärung, wie u.a. Laktat und Succinat, werden als Energiequelle für den späteren aeroben Abbau gespeichert. Acetat und Propionat werden hingegen in das umliegende Medium abgegeben, um das osmotische Gleichgewicht der Zelle aufrechtzuerhalten und eine weitere Ansäuerung zu verhindern (Grieshaber et al., 1994). Diese Ansäuerung kann zum Beispiel durch das Lösen von Carbonate aus der Schale bei *Arctia islandica* abgepuffert werden, wodurch eine Abnahme der Schalendicke beobachtet wurde (Oeschger, 1990).

Hypoxie-tolerante Tiere können durch Herabsetzen der Permeabilität der Zellmembran, den so genannten „channel arrest“, Energie für die Ionenregulation durch die aktiven Transporter (hauptsächlich die Na^+/K^+ -ATPase) einsparen. Das elektrochemische Potential und die zellulären Ionenkonzentrationen bleiben so stabil. Auf diese Weise können diese Organismen wesentlich länger unter O_2 -Mangel überleben als Hypoxie-sensitive Tiere (Boutilier & St-Pierre, 2000).

Kann nicht genügend ATP gebildet werden, um selbst den minimierten Energiebedarf der Zellen unter Stoffwechselreduktion zu decken, beginnt der Zelltod.

Unter schwerer Hypoxie, d.h. unter kritischem Sauerstoffmangel im Gewebe, kommt es darüber hinaus zu Änderungen des zellulären Redoxpotentials. In Säugerzellen kommt es bei O_2 -Mangel und Erniedrigung des Redoxpotentials zur Aktivierung des Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktors HIF-1 (Hypoxia inducible factor), dessen Zielgene das Überleben unter Hypoxie ermöglichen.

1.3. Oxidativer Stress

Sauerstoffradikale sind ein natürliches Nebenprodukt der aeroben Energiegewinnung in den Mitochondrien. Zu oxidativem Stress kommt es dann, wenn ein Übermaß an Sauerstoffradikalen gebildet wird, welches durch das antioxidative Potential des Gewebes nicht ausreichend „entgiftet“ wird. Es entstehen mehr Sauerstoffradikale, als die Antioxidantien zu neutralisieren in der Lage sind, so dass diese Radikale zu Schäden an Molekülen und Organellen führen können. Damit verbunden ist die Störung des zellulären Redoxpotentials, im Besonderen des Verhältnisses von oxidiertem zu reduziertem Glutathion und von NADH zu NAD. Unter Hypoxie steht zu wenig

Sauerstoff als finaler Elektronenakzeptor zur Verfügung, was zu einer Verlangsamung des mitochondrialen Elektronen-Transportes und einer zunehmenden Reduzierung von Redoxcarriern im Elektronentransportsystem der Atmungskette führt. Diese reduzierten Redoxcarrier können autoxidieren und Elektronen auf die wenigen vorhandenen Sauerstoffmoleküle übertragen, so dass Sauerstoffradikale entstehen (Moyes & Hood, 2003).

In Hypoxie-toleranten Tieren wurden nach Anoxie-Inkubationen große Mengen an Glutathion gemessen. Es wird davon ausgegangen, dass diese Tiere Glutathion bilden, um den unter Hypoxie entstehenden oxidativen Stress abzuf puffern (Abele & Puntarulo, 2004) und die bei der Reoxygenierung in großer Zahl entstehenden ROS (reactive oxygen species) abfangen zu können (Pannunzio & Storey, 1998; Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002).

1.4. Glutathion

Glutathion ist, im reduzierten Zustand (GSH), auf Grund seiner hohen Elektronen-Donator-Kapazität und hohen intrazellularen Konzentration – bis zu 11 mM in der Leber – (Abb. 1.4-1), der wichtigste Redoxpuffer in der Zelle (Schafer & Buettner, 2001; Reed, 1990). Im reduzierten Zustand besteht es aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin (γ -Glu-Cys-Gly). Im oxidierten Zustand (GSSG) sind zwei GSH über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Kidd, 1997; Hermes-Lima, 2004). In der Zelle liegt Glutathion hauptsächlich im reduzierten Zustand vor (Asensi et al., 1999), wobei das Verhältnis von GSSG/GSH abhängig ist vom Gewebe, der Spezies, dem Alter und dem Gesundheitszustand des Individuums (Hermes-Lima, 2004). Glutathion kann genutzt werden, um das Redox-Verhältnis und so den oxidativen Stress in Zellen und Geweben zu messen. Da es in viel höheren Konzentrationen vorliegt als die anderen Redoxpaare, wird es bevorzugt untersucht (Schafer & Buettner, 2001). Glutathion ist an vielen Zellfunktionen, wie der Aufnahme von Aminosäuren in die Zellen, dem Ascorbinsäure-Metabolismus (Hermes-Lima, 2004; Halliwell & Gutteridge, 1999) und der Aktivitätsregulierung vieler Enzyme mit kritischen Thiol-Gruppen beteiligt (Abb. 1.4-1) (Hermes-Lima, 2004). Glutathion selber reagiert ebenfalls spontan mit freien Radikalen und wird dabei oxidiert (Halliwell & Gutteridge, 1999). Diese Reaktion wird durch das hohe Redoxpotential von -0.33 V des Redoxpaares begünstigt (Kidd, 1997). Zusätzlich ist Glutathion auch an der Regeneration von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ beteiligt (Storey, 1996).

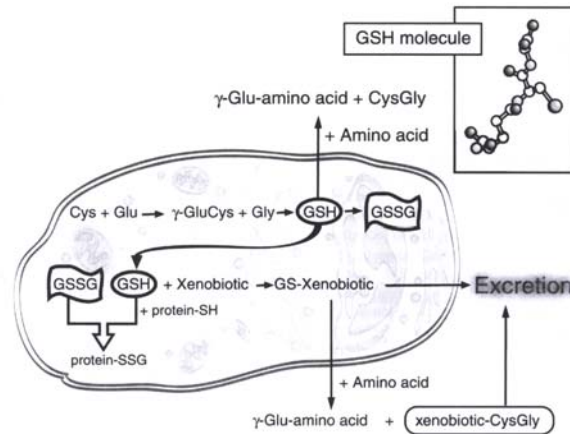


Abb. 1.4-1: Der Glutathion-Metabolismus in einer Leberzelle. Dargestellt ist die Biosynthese des GSH und weitere Einbauecke von GSH und GSSG. Nach Hermes-Lima 2004.

1.5. HIF-1 Hypoxie induzierbarer Faktor

Unter subkritischem O_2 -Mangel ist die aerobe Kapazität eines Gewebes eingeschränkt. Der kritische Sauerstoff-Partialdruck (PO_2), bei dem das ATP/ADP-Verhältnis ein Umschalten auf anaerobe Energiegewinnung bewirkt, ist zwar noch nicht erreicht, jedoch kann die maximale aerobe Leistungskapazität nicht mehr erbracht werden. Innerhalb dieses Übergangsbereichs gibt es bei allen aeroben Organismen verschiedene Anpassungsmechanismen, welche die Sauerstoffversorgung der Gewebe wieder herstellen sollen und die Zeit reduzierter Energieverfügbarkeit zu überbrücken helfen. Einige der wichtigsten Mechanismen sind die Veränderung der Neurotransmitterausschüttung, das Verschließen von Ionenkanälen (channel arrest) und auch eine Anpassung auf genetischer Ebene (Boutillier & St-Pierre, 2000). Unter Hypoxie werden verstärkt Gene exprimiert, wie z.B. glykolytische Enzyme und Glucosetransporter, die für die Nutzung anaerober Stoffwechselwege wichtig sind. Vor allem aber werden Gene wie Erythropoietin, VEGF (*vascular endothelial growth factor*; *Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor*) und das Eisentransportprotein Transferrin exprimiert. Sie sollen die O_2 -Versorgung der Gewebe verbessern bzw. wieder herstellen. Die Transkription dieser Gene wird durch den Transkriptionsfaktor HIF induziert, der damit eine zentrale Rolle in der Hypoxie-Regulation einnimmt (Semenza et al., 1994; Iyer et al., 1998). Es sind mittlerweile über 100 HIF-Zielgene bekannt, welche die HIF-Bindungssequenz 5'-RCGTG-3' (hypoxia responsive element) in ihrer Promotorregion besitzen und während einer akuten Hypoxie oder bei Langzeitanpassung an geringe Sauerstoffverfügbarkeit aktiviert werden (Kaelin, 2005).

HIF ist ein aus zwei Untereinheiten bestehendes Heterodimer, dessen Untereinheiten *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) Per/Arnt/Sim (PAS) Proteine sind (Jiang et al., 1996). Sie binden nur als Dimer an die DNA, um die Transkription von Zielgenen zu bewirken. Die beiden Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β werden konstitutiv in den Zellen exprimiert. Die Regulation von HIF erfolgt über den O₂-abhängigen Abbau der HIF-1 α Untereinheit, während HIF-1 β permanent und unabhängig vom O₂-Gehalt in der Zelle vorliegt (Jaakkola et al., 2001).

Der Abbau der HIF-1 α Untereinheit wird durch den von-Hippel-Lindau *Tumor-suppressor-Complex* (pVHL) vermittelt, der als Erkennungseinheit für E3-Ubiquitin-Ligase-Enzyme fungiert. Mindestens einer von zwei konservierten Prolinresten, die in der „Sauerstoff-abhängigen Abbau Region“ (ODD = *oxygen dependent degradation domain*) des HIF-1 α Proteins lokalisiert sind, wird durch Prolylhydroxylase-Enzyme (PHD) unter Verwendung von molekularem O₂ hydroxyliert. Die resultierenden Hydroxyproline können dann durch den von-Hippel-Lindau-Faktor (pVHL) erkannt werden. Die pVHL-Bindung ermöglicht die Polyubiquitinierung der HIF-1 α Untereinheit und damit den proteasomalen Abbau der Untereinheit und die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors insgesamt (Kaelin, 2005). Darüber hinaus fördert auch die Acetylierung des sich ebenfalls in der ODD befindenden Lysin532 den Abbau von HIF-1 α (Jeong et al., 2002).

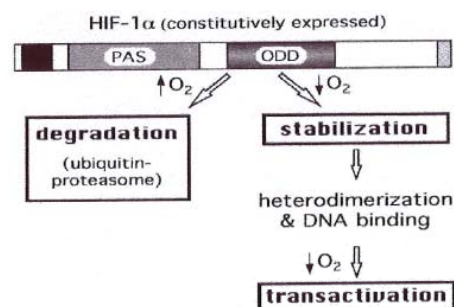


Abb. 1.5-1: Ein Modell für die Hypoxie-induzierte Aktivierung von HIF-1. Die bHLH-Domäne ist durch den linken schwarzen Kasten gekennzeichnet, während das C-Ende durch den rechten hellgrauen Kasten gekennzeichnet ist. Die durch O₂-Änderungen beeinflussten Schritte sind umrandet. Nach Huang et al., 1998.

Unter Hypoxie werden die Hydroxylierung und Acetylierung verhindert, wodurch sich die HIF-1 α Untereinheit anreichert, in den Zellkern wandert und dort mit der HIF-1 β Untereinheit dimerisiert. Neben O₂ haben auch der Eisengehalt sowie der Redoxzustand der Zelle Auswirkungen auf den Abbau der HIF-1 α Untereinheit. So benötigen die Prolylhydroxylasen Eisen (Fe²⁺) und Ascorbat (Vitamin C) als Kofaktoren (Acker &

Acker, 2004). Der Redoxzustand selbst hat ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivität der Prolylhydroxylase wie auch auf die Ubiquitin-konjugierten Enzyme, die HIF-1 α proteasomal abbauen (Jaakkola et al., 2001).

Molekularer Sauerstoff verhindert zusätzlich durch die Hydroxylierung des Asparagins in der C-TAD (C-terminale Transaktivierungs-Domäne) die Assoziation mit Koaktivatoren (z.B. p300), wodurch die Transaktivierungsfunktion von HIF-1 α unterdrückt wird (Lando et al., 2002).

Neben der C-TAD gibt es noch die N-TAD (N-terminale Transaktivierungs-Domäne) welche innerhalb der ODD zu finden ist. Beide Domänen sind durch eine Inhibitor-domäne (ID) voneinander getrennt, welche die beiden TAD's bei Normoxie inhibiert (Jiang et al., 1997).

Die C-terminale Hälfte der HIF-1 α Untereinheit besteht aus der O₂-abhängigen ODD, mit den beiden Prolinresten und dem Lysinrest, an welche pVHL bindet, sowie aus der C-TAD (Huang et al., 1998; Kaelin, 2005). Der C-terminale Genabschnitt ist damit für die Stabilität des Proteins und die Transaktivierung verantwortlich (Iyer et al., 1998). Dagegen beherbergt die N-terminale Hälfte die bHLH-Domäne, die für die Dimerisierung der beiden Untereinheiten und die Zielgenspezifität verantwortlich ist, sowie die PAS-Domäne, welche die Bindung an die DNA vermittelt (Huang et al., 1998; Iyer et al., 1998). Um in den Zellkern transportiert werden zu können, besitzt HIF-1 α noch zwei Kerntransportsignale (nuclear localisation signals, NLS) (Schmid et al., 2004). Die Anordnung der Untereinheiten des HIF-1 α ist in Abb. 1.5-2 zu sehen, in der die einzelnen Domänen und deren Lage dargestellt sind.

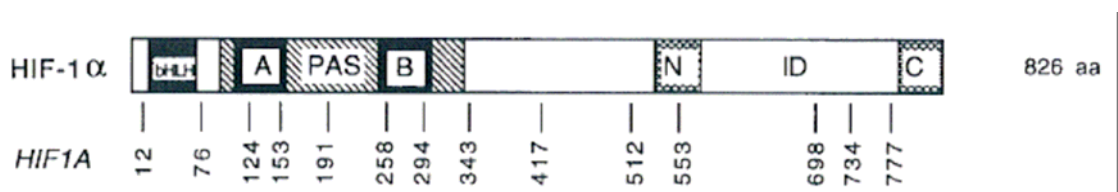


Abb. 1.5-2: Der Aufbau der menschlichen HIF-1 α Untereinheit mit der Lage ihrer Domänen.

Nach Iyer et al., 1998

1.6. *Arctica islandica*

Die Islandmuschel *Arctica islandica* ist auf dem arktisch-borealen Kontinentalschelf weit verbreitet (siehe Abb. 1.6-1). Ihr Temperaturtoleranzfenster liegt zwischen 0 °C und 19 °C, womit sie zu den borealen Tieren gehört (Witbaard et al., 1994).

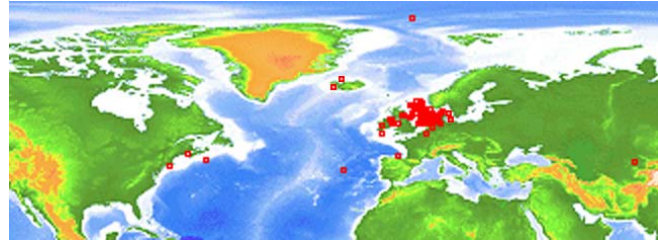


Abb. 1.6-1: Die Verbreitungskarte der Islandmuschel *Arctica islandica*. Verändert nach ocean biogeographic information system

Arctica islandica besiedelt weiche Sedimentböden und kommt üblicherweise in Tiefen zwischen 10-280 m vor. Sie wurde allerdings auch in einer maximalen Tiefe von 482 m gefunden (Holmes et al., 2003). Über ihre kurzen Siphone pumpt die Muschel Meerwasser in ihre Mantelhöhle, aus dem sie ihre Nahrung filtriert und O₂ aufnimmt.

Arctica islandica ist getrennt geschlechtlich und die externe Befruchtung findet in der Zeit von Juni bis November statt. Bis zur Geschlechtsreife mit 10-13 Jahren zeigen die Tiere ein schnelles Wachstum auf eine Größe von 6 cm, was sich danach verlangsamt (Holmes et al., 2003). Die Wachstumsrate ändert sich mit der geographischen Breite als Funktion der Wassertemperatur und der Nahrungsverfügbarkeit. In einer Population gibt es darüber hinaus saisonale Änderungen der Wachstumsrate, bedingt durch Reproduktion und jahreszeitliche Schwankungen in der Nahrungsverfügbarkeit (Schöne et al., 2005).

Untersuchungen von Oeschger (1990) haben gezeigt, dass *A. islandica* verschiedene Mechanismen besitzt, die es ihr erlauben, Langzeit-Anoxien (bis zu 1500 Stunden, was 62,5 Tagen entspricht) zu überleben. Die Stoffwechselrate war bereits nach 20 Tagen Anoxie auf weniger als 1% des aeroben Ausgangswerts gedrosselt. Die erheblichen Glykogenspeicher, über die die Tiere verfügen, wurden in der ersten Woche unter Anoxie stark abgebaut. Außerdem zeigte die Zunahme anaerober Stoffwechselprodukte, wie Succinat, Propionat und Acetat im Gewebe, dass *A. islandica* unter Langzeit-Sauerstoffmangel die anaeroben Stoffwechselwege der Mitochondrien aktivieren kann, um eine effiziente anaerobe Energiegewinnung zu ermöglichen.

Taylor (1976) untersuchte das Verhalten von *Arctica islandica* und berichtete, dass sich einzelne Individuen für 1-7 Tage, ohne erkennbaren äußeren Auslöser oder Periodik, tiefer in das Sediment eingraben. In dieser Zeit können sie kein Wasser über die Siphone in ihre Mantelhöhle aufnehmen und führen damit eine "selbst-induzierte" Anaerobiose herbei. Für dieses Verhalten ist kein offensichtlicher Grund bekannt, da sich einzelne Tiere unabhängig von der gesamten Gruppe eingraben. Es ist daher eher

unwahrscheinlich, dass es sich dabei um eine Flucht vor Fressfeinden oder physikalischen Störungen handelt. Da die Tiere nach unterschiedlich langer Zeit – in der Regel nach einigen Tagen – wieder an die Sedimentoberfläche zurückkehren, wird vermutet, dass der Nahrungsbedarf die Tiere dazu bringt, sich wieder an die Sedimentoberfläche zu begeben (Oeschger, 1990).

Während der selbstinduzierten Anoxie sinkt der pH-Wert im Mantelhöhlenwasser und Blut von *A. islandica* (Taylor, 1976). Darüber hinaus wird sowohl die Herzfrequenz auf 10% des normoxen Frequenzwerts, als auch die Energieumsatzrate des Tieres abgesenkt (Abele, 2002).

Der kritische PO_2 für *A. islandica* liegt bei 40-50 mm Hg (5,35-6,65 kPa) (Taylor & Brand, 1975). Auf der Zellebene ist der kritische PO_2 dadurch definiert, dass die O_2 -Diffusion zu den Mitochondrien die Rate der oxidativen Phosphorylierung zu begrenzen beginnt (Boutilier & St-Pierre, 2000). Unterhalb dieses Wertes atmen kleine *Arctica* (< 3 g Trockengewicht) oxykonform, d.h. der O_2 -Verbrauch nimmt mit dem PO_2 der Umgebung ab (Taylor & Brand, 1975), während große Tiere (> 3 g Trockengewicht) den O_2 -Verbrauch auch unterhalb dieser Konzentration noch konstant gegenüber dem Umgebungs- PO_2 halten (Oxyregulatoren) (Tschischka et al., 2000). Damit sind große Tiere bei umweltbedingten Hypoxien allerdings klar im Nachteil gegenüber oxykonformen Tieren (Abele, 2002).

1.7. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Hypoxieantwort von *Arctica islandica*. Dabei sollte über die Messung des Glutathionsystems sowohl die Veränderung der antioxidativen Kapazität, als auch des zellulären Redoxpotentials unter O_2 -Mangel bestimmt werden.

Ein weiterer Aspekt war der Transkriptionsfaktor HIF, da bisweilen noch nicht bekannt ist, ob HIF auch in Hypoxie-toleranten Evertebraten vorhanden ist und bei diesen Tieren eine Rolle im Rahmen der Hypoxieantwort spielt.

2. Material und Methoden

2.1. Tierhaltung und Versuchsaufbau

2.1.1. Tierbeschaffung und -haltung

Die aus der Ostsee stammenden Islandmuscheln *Arctica islandica* wurden im März 2005 vom Kieler Institut für Meereskunde in der Ostsee (54° 16' N; 11° 22' E) gesammelt und am 23. März 2005 nach Bremerhaven gebracht. Die etwa gleich großen Tiere (Höhe: 3,2-4,3 cm; Breite: 3,6-4,7 cm; Tiefe: 1,8-2,5 cm) wurden in natürlichem Seewasser bei 10 °C und einer Salinität von 24‰ (entsprechend der in situ Salinität) in 200-L-Aquarien mit einer ca. 6 cm dicken Aquarienkieschicht gehalten. Der Aquarienkies stammte aus dem Aquarienbedarf und hatte eine Korngröße von 6 bis 8 mm. Die Becken befanden sich in einem System mit ständiger Belüftung, Eiweißabschäumung und Biofiltration (Eheim, Deutschland). Die Wasserqualität (NH₄⁺- und NO₂⁻-Werte) wurde mittels Nanocolor Schnelltests der Firma Machery-Nagel (Düren, Deutschland) einmal pro Woche überprüft.

Die Muscheln wurden zweimal pro Woche mit zerstoßenen Planktontabletten (Dohse Aquaristik, Bonn, Deutschland) gefüttert.

Einige Tiere hatten sich während der Haltung teilweise im Aquarienkies eingegraben. Allerdings konnte sich keins der Tiere vollständig eingraben.

2.1.2. Hypoxie-Inkubation

Um den Einfluss von Sauerstoffmangel auf das zelluläre Redoxpotential bei *Arctica islandica* zu untersuchen, wurden jeweils 10 Tiere in einen abgeschnittenen Glaskegel (Abb. 2.1.2-1 (1)) mit einem Grundflächendurchmesser von 28 cm gesetzt. Darin befanden sich eine 1 cm dicke Kiesschicht und darüber eine 8-9 cm hohe Seewassersäule. Ein 75 cm hoher Glaszylinder (Ø 21 cm) (Abb. 2.1.2-1 (2)) wurde dicht abschließend über die Kegelöffnung gesetzt, um einen konstanten Sauerstoffgehalt von 1-2% im Wasser und in der Atmosphäre über dem Wasser zu erreichen (Abb. 2.1.2-1).

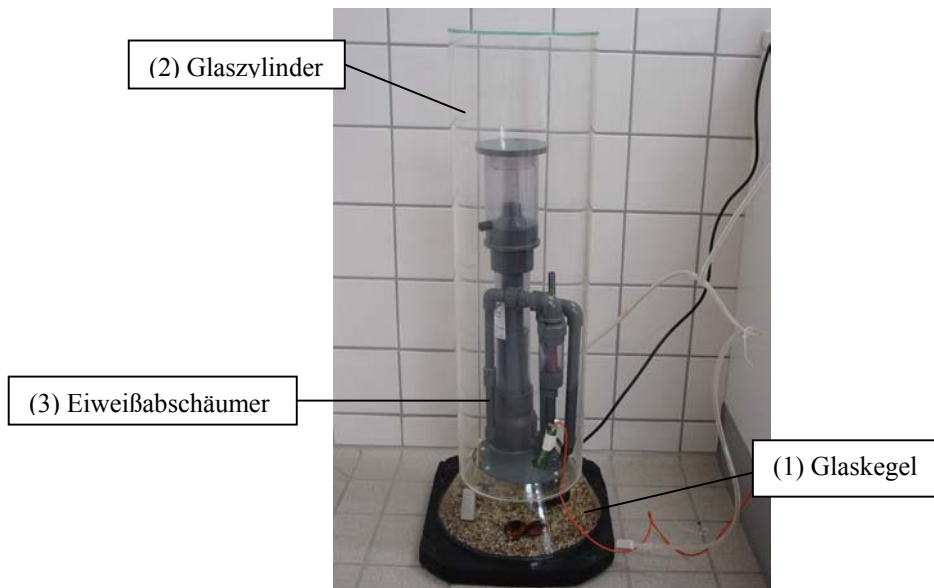


Abb. 2.1.2-1: Versuchsaufbau für die Hypoxie-Inkubation der Muscheln.

Über eine Gasmischpumpe (Wösthoff, Bochum) wurde der Sauerstoffgehalt im Wasser eingestellt und über die gesamte Inkubationsdauer mit einer Sauerstoff Micro-Optode (Typ PSt1 B2) und einem TX2-Gerät (PreSens, Regensburg, Deutschland) kontrolliert und aufgezeichnet. Über einen Eiweißabschäumer (Abb. 2.1.2-1 (3)), der in das Inkubationssystem integriert wurde, sollte während der Inkubationszeit eine gleichbleibende Wasserqualität trotz des geringen Wasservolumens garantiert werden. Trotzdem musste das Wasser zwischen den Inkubationen gelegentlich gewechselt werden, da die Ammonium- und Nitrit-Konzentrationen über den Grenzwerten (0,4 und 0,2 mg/L) lagen. Es wurden jeweils 10 Tiere für 6, 12, 24, 48 und 168 Stunden (1 Woche) bei 1-2% O₂ inkubiert. Während der Inkubationsdauer wurden die Tiere nicht mehr gefüttert.

2.1.3. Probennahme

Vor Beginn der Versuchsreihe wurden von 15 Kontrolltieren Gewebeproben genommen. Um ein schnelles Arbeiten zu ermöglichen, wurde die Probennahme zu zweit durchgeführt, damit die zu untersuchende RNA in den Geweben möglichst intakt blieb und biochemische Prozesse während der Präparation minimiert wurden. Es wurden die Kiemen, die Mitteldarmdrüse und der Mantel (in dieser Reihenfolge) entnommen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Präparation einer Muschel dauerte im Schnitt 3-4 min. Die Gewebe wurden anschließend bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2. Messung der Glutathionkonzentration und des Redoxpotentials im Gewebe

Glutathion liegt im reduzierten Zustand als Tripeptid (γ -Glu-Cys-Gly) vor und bildet im oxidierten Zustand ein aus zwei GSH (Glutathion-Sulfhydryl) bestehendes Disulfid (GSSG, Glutathiondisulfid). Durch die hohe Elektronen-Donator-Kapazität des GSH und die hohe Konzentration (bis zu 10 mM in der Leber), in der es in den Zellen vorkommt, ist es ein starkes Reduktionsmittel. Das Redoxpaar (GSH/GSSG) hat ein hohes negatives Redoxpotential von -0,33 V, weshalb es an vielen Zellschutzfunktionen – sowohl als Antioxidant als auch als Substrat für antioxidative Enzyme – beteiligt ist. Das Verhältnis von GSSG zu GSH in der Zelle gibt Auskunft über das Redoxpotential und damit über oxidativen Stress im Gewebe. Aufgrund der hohen Konzentration, in der dieses Redoxpaar vorliegt, eignet sich Glutathion sehr gut für die Bestimmung des Gewebe-Redoxpotentials. Für die Berechnung dieses Potentials ist jedoch die vorherige Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes notwendig (siehe folgenden Abschnitt).

2.2.1. Messung des intrazellulären pH-Wertes (pHi), nach Pörtner *et al.* (1990)

Zur Bestimmung des internen Gewebe-pH-Werts (pHi) wurde das Gewebe unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in einem 0,5-ml-Reaktionsgefäß mit 150 μ l vorgelegtem Medium (pH 6,9; 160 mmol/l Kaliumfluorid, 2 mmol/l Nitriлотriessigsäure, Sigma Chemicals, St. Louis, USA) gemischt. Um eine Ansäuerung des Gewebes durch kondensiertes CO₂ zu vermeiden, sollte ein Kontakt von Gewebepulver mit Luft möglichst vermieden werden. Daher wurde das Reaktionsgefäß schnell mit Medium aufgefüllt und luftblasenfrei verschlossen. Um das Gewebe besser aufschließen zu können, wurde es für eine Minute bei -7 °C mit Ultraschall (Sonifier 450, Branson, Emnes, Niederlande) behandelt und anschließend für 30 sek. bei 4 °C und 20.000 g zentrifugiert. Im Überstand wurde anschließend der pHi bestimmt (pH-Elektrode: SenTix Mic). Die Probe wurde während der gesamten Messung auf 10 °C (Hälterungstemperatur) temperiert, um den *in situ* pHi-Wert zu bestimmen. Die Elektrode wurde mit Präzisions-Eichpuffern (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) kalibriert, und die Messung mit einem Schreiber ausgewertet.

2.2.2. Glutathion-Bestimmung nach Farris & Reed (1987)

Der Glutathiongehalt wurde nach Farris & Reed (1987) bestimmt. Dazu wurde das gefrorene Gewebe unter flüssigem Stickstoff gemörsert und mit vorgekühlter und N₂-begaster Perchlorsäure (PCA) (10% mit 2 mM Batho-Phenantrolin-Disulphonsäure, BPDS) im Verhältnis 1 : 10 (w/v) homogenisiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 15.000 g und 4 °C wurden 500 µl Überstand abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 10 µl pH-Indikator-Lösung, die gleichzeitig das Derivatisierungsreagenz Iodessigsäure enthielt (1 mM m-Kresol purpur Natriumsalz mit 0,5 M Iodessigsäure (IAA)), gemischt. Darüber hinaus wurden zu jeder Probe 50 µl interner Standard (1 mM γ -Glutamyl-glutamat in 0,3% PCA) gegeben.

Anschließend wurde der pH-Wert mit 5 M KOH (mit 0,3 M N-Morpholino-Propan-Sulfonsäure, MOPS) auf 8,5 eingestellt, und die Probe für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das GSH vollständig zu derivatisieren. Durch Bindung mit Iodessigsäure wird die Oxidation des freien GSH zu GSSG verhindert. Danach wurde wieder für 5 min bei 4 °C und 15.000 g zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden mit 600 µl 1% 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzen (FDNB) gemischt und über Nacht in dunklen Eppendorfreaktionsgefäßen bei Raumtemperatur derivatisiert. Die derivatisierten Proben wurden 1 min bei 7.500 g und 4 °C zentrifugiert, durch einen 0,2 µm Nylonmembranfilter filtriert und in dunklen HPLC-Fläschchen bei -20 °C eingefroren.

Die derivatisierten Proben wurden mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) gemessen. Das System (Firma Beckmann) besteht aus einer binären Pumpe, einem Probenaufgeber, einer 5 µm NH₂-Säule (4 mm x 250 mm; Waters Spherisorb NH₂[®]), einem Säulenofen (38 °C) und einem Photodioden-Array Detektor (λ 365 nm).

Die Trennung erfolgte über ein binäres Gradientensystem. Lösungsmittel A bestand aus 80% Methanol / H₂O und Lösungsmittel B aus 80% Lösungsmittel A und 20% 0,5 M Natriumacetat (als Ionenpaarreagenz: 500 g Na-Acetat in 224 ml MilliQ Wasser gemischt mit 695 ml konzentriertem Eisessig). Alle verwendeten Chemikalien waren HPLC-grade. Beide Lösungsmittel wurden entgast (Ultraschall und Degaser), und Lösungsmittel B zusätzlich filtriert (0,45 µm Porengröße). Die Flussrate betrug 1,2 ml min⁻¹. Das Gradientenprogramm (Mischungsverhältnis in % A/B) lief wie folgt: Für 8 min 92/8, anschließend für 42 min ein linearer Gradient auf 1/99. Im Anschluss wurde innerhalb von 5 min wieder auf das Ausgangsverhältnis (A:B = 92:8) zurückgefahren und die Säule bei diesem Verhältnis für 15 min reequilibriert.

2.2.3. Berechnung der Ergebnisse

Die Flächen der GSH- und GSSG-Elutions-Peaks wurden mit Hilfe von Sechs-Punkt-Eichreihen für GSH- und GSSG-Standards, die aus einer Stammlösung hergestellt und wie die Proben behandelt worden waren, in Glutathionkonzentrationen umgerechnet.

Da GSSG aus zwei oxidierten GSH-Molekülen besteht, errechnet sich der Gesamtglutathiongehalt $[GSH_{ges}]$ wie folgt:

$$[GSH_{ges}] = 2 \cdot GSSG + GSH$$

Darüber hinaus wurde das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion (GSSG/GSH) berechnet:

Das *in situ* Redoxpotential berechnet sich unter Einbeziehung des intrazellulären pH-Wertes und der Temperatur aus der Nernst Gleichung (wie bei Schafer & Buettner, 2001 beschrieben):

$$\Delta E = E^{pH} - (RT \cdot 2,303 / nF) \log ([GSH]^2 / [GSSG]) \text{ mV}$$

Die Messung des pH_i ist unter 2.2 beschrieben.

2.2.4. Statistik

Alle Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen wurden nach Nalimov (1980) auf Ausreißer hin geprüft. Ein Wert wurde als Ausreißer angesehen, wenn seine zuvor ermittelte Prüfgröße oberhalb der 95%-Grenze der Prüfgrößenverteilung lag.

Die Daten wurden anschließend mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (Statistika) auf Normalverteilung und dem Levene-Test (Statistika) auf Varianzenhomogenität getestet. Fielen beide Tests positiv aus, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, Statistika) durchgeführt. Mit dem sich anschließenden Post Hoc-Test (*Least Significant Difference*-Test) wurde geprüft, welche Versuchsgruppen sich signifikant voneinander unterscheiden.

Die Ergebnisse werden im Folgenden, wenn nicht anders erwähnt, als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Signifikanzen beziehen sich jeweils auf eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde SigmaPlot 8.0 für Windows verwendet.

2.3. Molekularbiologische Untersuchungen

Für die Untersuchung der Hypoxie-Antwort auf genetischer Ebene wurde RNA aus dem Gewebe der Islandmuschel isoliert, aus der dann Referenzsonden für Expressionsstudien der α -Untereinheit des Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktors (HIF-1 α) isoliert werden sollten.

2.3.1. Vorbereitungen für das Arbeiten mit RNA

Im Vergleich zur DNA ist RNA durch eine zusätzliche Hydroxyl-Gruppe im Ribosering anfällig für den spontanen und katalytischen Abbau. RNasen, die RNA abbauenden Enzyme, kommen fast überall vor, so auch auf unserer Haut. Sie sind sehr stabil und auch nach Denaturierungen schnell wieder renaturiert, weshalb die Arbeit mit intakter RNA besondere Vorkehrungen benötigt. Alle Arbeiten müssen steril und mit Handschuhen durchgeführt werden. Dazu dürfen nur sterile Pipettenspitzen, Eppendorfreaktionsgefäße, Glasgeräte und Lösungen benutzt werden. Der Arbeitsplatz muss vor der Arbeit mit 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Sämtliche Lösungen, die nicht gekauft werden, werden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltem destilliertem Wasser angesetzt. DEPC hemmt Enzyme, darunter auch RNasen. Um es nach der Inkubation wieder aus dem Wasser zu entfernen, wird das Wasser autoklaviert, wobei das DEPC zu CO₂ und Ethanol zerfällt. Glasgeräte werden für 4 Stunden bei 180 °C sterilisiert. Alle anderen Geräte, die so hohen Temperaturen nicht ausgesetzt werden können, werden autoklaviert.

2.3.2. RNA-Isolierung

Die Isolierung qualitativ hochwertiger RNA aus Muschelgewebe erwies sich als ausgesprochen schwierig, weshalb im Laufe dieser Arbeit verschiedene Methoden getestet wurden. Schließlich erwies sich die Kombination einer modifizierten Isolierung mit TRIzol[®] (phenolbasierend; von Invitrogen, Karlsruhe), eines DNase-Verdau und der anschließenden Reinigung mittels des RNeasy-Mini-Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) als am besten geeignet.

Nachfolgend ist das endgültige Protokoll beschrieben:

Frisches Muschelgewebe, 100-300 mg, wurde in 3 ml TRIzol[®] in einem Glaspotter (15 ml) mit einem Teflonpistill bei 200 rpm und zusätzlich für zwei Minuten mit einem Ultra-Turrax (IKA Labortechnik) homogenisiert. Entgegen den Hersteller-Angaben (zügiges Weiterarbeiten) wurde das Homogenat erst nach einer Stunde Inkubation bei

Raumtemperatur weiterbearbeitet. Es wurde dann bei 12.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um unlösliche Gewebereste zu entfernen. Der dabei entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform (p.A.) wurde das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss für 15 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere RNA-haltige, wässrige Phase wurde, ohne die anderen beiden Schichten zu verletzen, abgenommen und mit 0,5 ml Isopropanol (p.A.) zur Fällung der RNA versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation bei 7.000 g und 4 °C für 10 min. Das resultierende RNA-Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, vollständig getrocknet und schließlich in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan)/HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA (Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure)) gelöst. Um das Pellet vollständig zu lösen, wurde das Reaktionsgefäß für 20 min bei 50 °C in einem Wärmeblock unter Schütteln inkubiert.

2.3.3. DNA-Verdau

Um noch vorhandene DNA-Reste zu entfernen, erfolgte im Anschluss an die RNA-Isolierung ein DNA-Verdau. Dazu wurden 30 µl RNA-Lösung mit 1 µl DNase (5U/µl; Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.4. RNA-Reinigung

Zur Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen, die beim TRIzol[®]-Protokoll in der RNA-Lösung mit angereichert wurden, und zur Entfernung der DNA-Reste und der DNase, wurde die RNA mit dem RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) behandelt, bei dem die Reinigung über eine Silikatmembransäule erfolgt. Es wurde das "RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup" angewendet. Dazu wurden maximal 100 µg RNA pro Säule eingesetzt.

Die in TE-Puffer gelöste RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und mit 350 µl RLT-Puffer (Denaturierungslösung; Guanidinisothiocyanat) gut gemischt. Da die RNA nun bereits zum zweiten Mal gereinigt wurde, konnte abweichend vom Protokoll des Herstellers auf eine Zugabe von β-Mercaptoethanol zu der Denaturierungslösung verzichtet werden. Die nachfolgenden Schritte wurden wie im Protokoll beschrieben durchgeführt. Zum Schluss wurde die RNA zweimal mit 30 µl TE-Puffer von der Membran eluiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.3.5. Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA

Die Reinheit und Konzentration der RNA wurden zunächst photometrisch bestimmt. Reine RNA enthält keine Proteine und Phenole. Die Messung ist bezüglich der Konzentration und Reinheit der RNA stark pH-abhängig. Um den pH-Wert während der Messung zu puffern und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Messung in TE-Puffer vorgenommen. Dazu wurden 1 µl RNA mit 60 µl TE-Puffer (pH 7,5) in einer UV-Einmal-Küvette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gegen TE-Puffer gemessen. Die Konzentration der RNA lässt sich aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm, der Verdünnung, und einem für DNA und RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor (siehe unten) mit folgender Formel berechnen:

$$RNA\ Menge\ [\mu g / mgFG] = \frac{\left(OD_{260} \cdot 40\ \mu g / ml \cdot \frac{V_{Küvette}}{V_{Probe}} \right) \cdot V_{Elution}}{FG}$$

$V_{Küvette}$ = Küvettenvolumen [ml]

V_{Probe} = Probenvolumen [ml]

$V_{Elution}$ = Elutionsvolumen [ml]

FG = Frischgewicht [mg]

Bei 260 nm entspricht eine Absorptionseinheit 40 µg/ml RNA, woraus sich der Multiplikationsfaktor ergibt:

$$40 \cdot A_{260} = \mu g / ml [RNA]_{Probe}$$

Die Reinheit der Probe wird in dem Verhältnis der OD bei 260 nm zu der OD bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum für Proteine und Phenole, ausgedrückt. Die $OD_{260/280}$ sollte bei reiner RNA zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Ist dieser Wert kleiner als 1,8 liegt eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenolen vor.

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde eine Formaldehyd-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird die RNA in einem denaturierenden 1%igen Agarose-Formaldehydgel (FA-Gel) der Größe nach aufgetrennt. Es sollten beide Untereinheiten der Hauptbestandteile von Gesamt-RNA, die 18S rRNA und die 28S rRNA, zu erkennen sein, während die anderen RNA-Komponenten aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Konzentration mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden können.

Für 100 ml Gel wurde 1 g Agarose mit FA-Gel-Puffer (20 mM MOPS, pH 7,0; 8 mM Natriumacetat und 1 mM EDTA) aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) und 1,8 ml 37%igem Formaldehyd versetzt. Das handwarme Gel wurde in die mit DEPC behandeltem Wasser gespülte Gelapparatur mit Kamm gegossen und nach ungefähr 20 minütiger Abkühlung mit ca. 1 Liter FA-Gelpuffer bedeckt. 2-3 µg RNA wurden mit Gelladepuffer (62,5% Formamid, 9,25% Formaldehyd, MOPS Puffer, 50 µg/ml Bromphenolblau und 50 µg/ml Xylencyanol) versetzt und direkt vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 65 °C denaturiert. Die RNA wurde bei einer Spannung von 70 V für 2-3 Stunden aufgetrennt.

Alternativ wurde zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der RNA eine Kapillarelektrophorese im Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde die RNA in geringen Mengen (max. 500 ng) auf einen Chip aufgetragen, und über kleine, mit einer Gelmatrix beladene Kapillaren elektrophoretisch ihrer Größe nach getrennt. Das Messergebnis wird als Elektropherogramm (Abb. 2.3.5-1) und Gelbild dargestellt. Die Integrität und die Qualität der RNA kann daraus abgeleitet werden. Die Messungen wurden gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

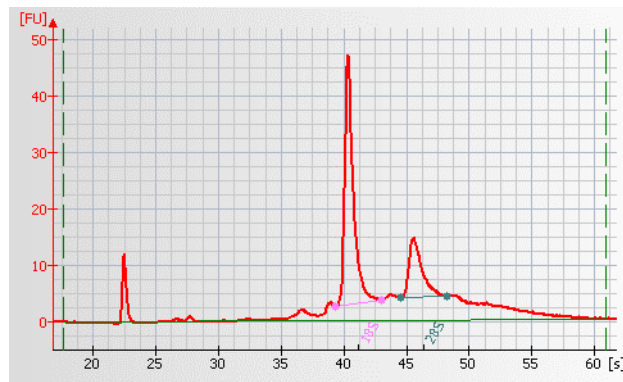


Abb. 2.3.5-1: Ergebnis der RNA-Messung in der Kapillarelektrophorese.

Bei 41 s ist der Peak der 18S rRNA und bei 46 s der Peak der 28S rRNA zu sehen.

2.3.6. Herstellung spezifischer Starteroligonukleotide (Primer)

Für die Konstruktion der Primer für die reverse Transkription und die sich anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden bereits publizierte und eine unpublizierte Sequenz (HIF-Sequenz) des gesuchten Gens möglichst nah verwandter Arten mit Hilfe von „Clustal W“ (Mac Vector 7.2, Oxford Molecular plc, Oxford, Großbritannien) verglichen. Für den vermutlich nächststehendsten Verwandten, in dieser Arbeit möglichst eine Muschel oder ein Evertrebrat, wurde dann eine Primersuche

mittels Mac Vector 7.2 durchgeführt. Aus der Sequenzanalyse wurden Primerpaare aus möglichst konservierten Abschnitten ausgewählt. An unklaren Positionen wurden Nukleotidmischungen bei der Synthese verwendet.

Für die Primer wurden folgende Sequenzen zugrunde gelegt:

HIF-1 α : *Caenorhabditis elegans* (NM 075607) und *Danio rerio* (AY 835381) aus der Genbank, die Positionen beziehen sich auf den codierenden Bereich der *Danio rerio* Sequenz

HIF-1 α : *Daphnia magna*-Sequenz von Hideo Yamagata, Tokyo University of Pharmacy and life science, unveröffentlicht

Actin: *Dreissena polymorpha* (HF 082863)

18S rRNA: *Arctica islandica* (U 93555)

Tab. 2.3.6-1: Verwendete Primer für die reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion

Fragment	Primer-bezeichnung	Sequenz	Position	Länge
HIF-1 α	Ai HIF-F1	5' CAYCCATCCGACYATGASGAG 3'	403 - 424	476 bp
	Ai HIF-B2	5' TGTCCTTTKGCRAAMAGKTC 3'	879 - 859	
	Ai HIF-F1	5' CAYCCATCCGACYATGASGAG 3'	403 - 424	1015 bp
	Ai HIF-B4c	5' GTCGGGAGGTRYGAGMTGACG 3'	1417-1397	
	Ai HIF-B4d	5' GTCGGGAGGTRYGAGMTGAGG 3'		
Actin	Mact-F1	5' GWGTGATGGTTGGTATGGGWCAG 3'	178 - 201	487 bp
	Mact-B2	5' GCKGTGGTTGTGAAWGARTARCC 3'	665 - 642	
	Mact-F4	5' GAACACGGYATCGTCACMAACTG 3'	267 - 290	468 bp
	Mact-B3	5' CATTTCYTG YTCRAAGTCMAGWGC 3'	735 - 711	
	Mact-F4	5' GAACACGGYATCGTCACMAACTG 3'	267 - 290	910 bp
	Mact-B8	5'AGCAYTTYCTGTGGACWATGGATGG3'	1177-1152	
18S rRNA	Ai 18S-F3	5' TGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCG 3'	711 - 735	244 bp
	Ai 18S-B4	5' GGCAAATGCTTTTCGCTGTAGTTC 3'	955 - 932	
HIF-1 α	Ai HIF-DF1	5' SMAAAGRAAARGAGRSGGAAYTCGG 3'	100 - 125	422 bp
	Ai HIF-DB1	5' AGYTCVTCRTGRTCGCASGGGTG 3'	522 - 499	
	Ai HIF-DB2	5' CCAACGGCATTTC AATGTTGGATGG 3'	841 - 817	742 bp
	Ai HIF-DB3	5' TCATCGACATAGGTGTA CTTTCATATCC 3'	899 - 873	

2.3.7. Reverse Transkription

Das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA, die später für die PCR als Matrize eingesetzt wurde, erfolgte in 0,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Alle Reagenzien

wurden auf Eis aufgetaut und pipettiert. Die reverse Transkription wurde in einem 40- μ l-Ansatz mit insgesamt 0,2 μ g RNA durchgeführt, der für zwei PCR-Ansätze ausreichte. Die Synthese erfolgte in drei Schritten.

1. Zu 0,2 μ g RNA wurden 6 pmol Reverse Primer und 0,625 mM dNTP-Mix (25 mM dATP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP, 25 mM dCTP) gegeben und mit DEPC-Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Damit sich die Primer an die RNA anlagern konnten, wurde der Ansatz für 5 min bei 65 °C inkubiert (Auflösung der RNA-Sekundärstrukturen) und anschließend für 1 min auf Eis gestellt.
2. Es wurden 4 μ l PCR-Puffer der Firma Invitrogen, Karlsruhe (20 mM Tris/HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 10 mM DTT (Dithiothreitol), 2,5 mM MgCl₂ und 9,2 μ l DEPC-Wasser zu dem Ansatz gegeben. Der Ansatz wurde dann für 1 min bei 42 °C inkubiert.
3. Im letzten Schritt wurde die Transkriptions-Reaktion durch Zugabe von 2 μ l Reverse Transkriptase (200 U/ μ l; SuperScript RT RNase H⁻ der Firma Invitrogen, Karlsruhe) gestartet und für 65 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 70 °C zur Inaktivierung des Enzyms inkubiert.

2.3.8. Amplifizierung von cDNA-Fragmenten mittels

Polymerasekettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction)

Bei einer PCR werden spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. Die Spezifität wird über die Primer, synthetisch hergestellte Starteroligonukleotide (siehe Tab. 2.3.6-1), die der DNA-Polymerase ein freies 3'OH-Ende zur DNA-Synthese bieten, bestimmt.

Eine PCR besteht aus drei Reaktionsschritten: der Denaturierung, der Hybridisierung (Primer-Anlagerung) und der DNA-Synthese. Die Denaturierung erfolgt bei 94 °C, wobei die beiden Stränge der Ausgangs-DNA getrennt werden. Für die sich anschließende Hybridisierung der Primer wird die Temperatur auf 55-58 °C abgesenkt. Sie richtet sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Primer, die durch deren Länge (in der Regel 18-30 Basen) und Guanidin-Cytosin-Gehalt (40-60%) bestimmt ist. Für die DNA-Synthese wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, was dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase entspricht. Von den Primern aus wird der komplementäre DNA-Strang durch die Polymerase verlängert bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Die Zeit für die DNA-Synthese muss der erwarteten Fragmentlänge angepasst werden (Synthesegeschwindigkeit etwa 1 kb pro min).

Dieser aus drei Schritten bestehende Zyklus wird bis zu vierzigmal wiederholt, wodurch die Ausgangs-DNA exponentiell vervielfältigt wird.

Es wird eine abschließende 8 minütige Synthesephase angefügt, um eine vollständige DNA-Synthese durch die Polymerase sicher zu stellen.

Um die Hybridisierungstemperatur zu optimieren, wurde über acht Reaktionsansätze à 20 µl ein Temperaturgradient von ± 6 °C zu der kalkulierten Optimaltemperatur angelegt. Für jeden Ansatz wurden 2 µl des Transkriptionsansatzes mit 20 pmol des entsprechenden Primerpaares, 20 mM Tris/HCl, pH 8,4; 50 mM KCl, dNTP-Mix (0,5 mM je dATP, dGTP, dTTP, dCTP) und 1U Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) gemischt. Die Taq-Polymerase synthetisiert einen Desoxy-Adenosin-Überhang an das PCR-Produkt, der bei der späteren Klonierung (2.3.11) von Vorteil ist. Neben der Hybridisierungstemperatur wurde auch die MgCl₂-Konzentration zwischen 1,5 und 2,0 mM variiert; weniger MgCl₂ und hohe Temperaturen erhöhen die Spezifität der Reaktion, wodurch aber die Produktausbeute gesenkt wird. Das Endvolumen wurde mit DEPC-Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

Für die PCR wurde ein Thermocycler T Gradient der Firma Biometra, Göttingen benutzt. Das verwendete Temperaturprogramm sah wie folgt aus:

1. Denaturierung: 94 °C für 4 min
 2. Hybridisierung: 58 °C \pm 6 °C für 90 sek
 3. DNA-Synthese: 72 °C für 45 sek
 4. Denaturierung: 94 °C für 45 sek
 5. Hybridisierung: 58 °C \pm 6 °C für 90 sek
 6. DNA-Synthese: 72 °C für 8 min
 7. 4 °C bis zum Programmende
- } 32 Zyklen

Zusätzlich zu dem beschriebenen PCR-Programm wurde ein *Touch-down*-Programm für die HIF-Primerpaare verwendet (siehe Tab. 2.3.8-1)

Tab. 2.3.8-1: Benutzte PCR-Programme

Pimerpaar	PCR-58 °C	PCR-Touchdown 55 °C
Ai HIF-F1-B1		55 °C & 50 °C
Ai HIF-F1-B2		X
Ai HIF-F1-B4c		X
Ai HIF-F2-B4c		X
Mact-F1-B2	X	
Mact-F4-B3	X	
Mact-F4-B8	X	
Ai 18S-F3-B4	X	
Ai HIF-DF1-DB1	X	X
Ai HIF-DF1-DB2	X	X
Ai HIF-DF1-DB3	X	X

In einem *Touch-down*-Programm fällt die Hybridisierungstemperatur von Zyklus zu Zyklus um 1 °C im ersten Zyklenblock, an den sich ein zweiter temperatur-konstanter Zyklenblock anschließt. Beide Blöcke haben zusätzlich den oben beschriebenen ± 6 °C Gradienten. Durch das größere Temperaturfenster, das mit einer *Touch-down*-PCR abgedeckt wird, kann die optimale Hybridisierungstemperatur für das gesuchte PCR-Produkt genauer ermittelt werden.

2.3.9. Agarosegel

Mittels eines 1,3%igen Agarosegels wurden die PCR-Produkte ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fragmente mit der gesuchten Größe (siehe Tab. 2.3.6-1) konnten dann aus dem Gel isoliert werden. Für 100 ml Gel wurden 1,3 g Agarose mit 10 ml 5x-TBE-Puffer (0,45 M Tris-Borat, 10 mM EDTA, pH 8,3) der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und 90 ml MilliQ Wasser aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50-60 °C wurden vor dem Gießen 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel mit 0,5x TBE-Laufpuffer (Zusammensetzung wie oben beschriebener TBE-Puffer) bedeckt. Zu jeder Probe wurden 3-4 µl Gel-Ladepuffer (1,5 g/ml Ficoll, 1,5 mg/ml Xylenblau, 1,5 mg/ml Bromphenolblau gelöst in TE-Puffer) gegeben. Die Farbstoffe migrieren wie DNA-Fragmente im Gel. Bei der verwendeten Agarose-Konzentration wandert Xylenblau auf der Höhe eines 2-3 kb Fragments und Bromphenolblau auf der Höhe eines 120-200 bp Fragments. Auf diese Weise lässt sich das Trennverhalten der DNA im Gel verfolgen. Es wurden 20 µl jeder Probe in die Geltaschen aufgetragen. Von dem Längenstandard (100 bp DNA Leiter, Invitrogen, Karlsruhe) wurden 10 µl (=1 µg DNA) aufgetragen.

Die Fragmente wurden bei einer Spannung von 120 V (10 V / cm²) in ca. 2 Stunden aufgetrennt.

Die mit Ethidiumbromid markierte DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht. Auf diese Art identifizierte Fragmente mit der gesuchten Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten.

2.3.10. DNA-Isolierung aus dem Gel

Die ausgeschnittenen PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit der Firma Qiagen (Hilden) aus dem Gel isoliert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet und die jeweilige DNA in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.3.11. Klonierung, Plasmid-Isolation und Sequenzierung

Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit dem TOPO-TA-Cloning-Kit von Invitrogen, Karlsruhe für eine weitergehende Charakterisierung/Sequenzierung und zur geplanten Herstellung von Sonden kloniert.

Die Klonierung erfolgte wie im Herstellerprotokoll beschrieben. Als kompetente Zellen wurden "TOP10 One Shot Chemically Competent *E. coli* Zellen" verwendet. Das PCR-Fragment wurde direkt mit Hilfe des in der PCR-Reaktion generierten Desoxy-Adenosin-Überhangs, der den Einbau in die Bakterien-DNA erleichtert, mit dem Vektor pCR4-TOPO ligiert. An den bereits linearisierten Vektor ist eine Topoisomerase gebunden, die zum einen die Religation des Vektors verhindert, zum anderen die Ligation des DNA-Fragments mit dem Vektor katalysiert, wodurch ein rekombinantes Plasmid entsteht.

Dieses rekombinante Plasmid wurde in chemisch-kompetente Zellen (*Escherichia coli*; TOPO 10; Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 deoR araD139* Δ(*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R)*endA1 mupG*, Invitrogen, Karlsruhe) transformiert, welche anschließend zur Selektion auf Agarplatten mit Antibiotikum (LB-Medium (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl) 15 g/L Agar und 100 µg/ml Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. 6-8 einzelne Kolonien von jedem Ansatz wurden in 5 ml Flüssigmedium (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) überimpft und auf einem Schüttler (140 rpm) bei 37 °C für 20 Stunden kultiviert.

Die Plasmide wurden mit dem QIAprep-Mini-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und aufgereinigt.

Anschließend wurden die Plasmide zur Kontrolle der Fragmentgröße mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und in einer Gelelektrophorese (1%iges Agarosegel, genaue Angaben s.o.) analysiert.

Die Sequenzbestimmung der entsprechenden Fragmente wurde von der Firma MWG-Biotech in Ebersberg (Deutschland) mit Hilfe eines automatischen Sequenzers (ABIprism 377, Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Es konnten Fragmente mit einer Länge von bis zu 900 bp analysiert werden (PHRED 20 Qualität).

Dazu wurden 2-3 µg Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß in einer Vakuum-Zentrifuge (Vacuum Concentrator, Bachofer) getrocknet. Von jedem Fragment wurden mehrere Klone, die in beide Richtungen sequenziert wurden (mittels T3- oder T7-Primern), eingeschickt. Auf diese Weise wurden beide Stränge der DNA analysiert, und die Klone konnten miteinander verglichen werden.

2.3.12. Computergestützte Sequenzanalyse

Die Sequenzdaten wurden in Form von Text- und scf-Dateien von MWG-Biotech geliefert und mit Hilfe von MacVector 7.2 analysiert. Dazu wurden die Sequenzen in einer Internet-Gendatenbank (Genbank, National Centers for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) mit Hilfe des BLAST-Programms mit publizierten Sequenzen verglichen. Dabei lieferte die "Blast-Suche" einen ersten Hinweis über die konservierten Bereiche und gab die Ähnlichkeit mit publizierten Sequenzen an.

Wenn konservierte Bereiche nahe verwandter Organismen existierten, erfolgte ein Vergleich der Sequenzen mit Hilfe des Programms Clustal W (MacVector 7.2).

3. Ergebnisse

3.1. pHi-Werte in den unterschiedlichen Geweben unter Hypoxie

Der pHi in Mantel, Kieme und Mitteldarmdrüse der Islandmuschel *Arctica islandica* blieb auch nach zwei- bzw. fünftägiger hypoxer Inkubation unverändert. Im Vergleich der Gewebe ist der pHi in der Mitteldarmdrüse geringfügig saurer als in den beiden anderen Geweben (Abb. 3.1-1), während das Mantelgewebe den höchsten/basischsten pHi aufweist. In allen drei Geweben ist der pHi leicht unter 7, und die Gewebe damit leicht sauer (Tab. 3.1-1).

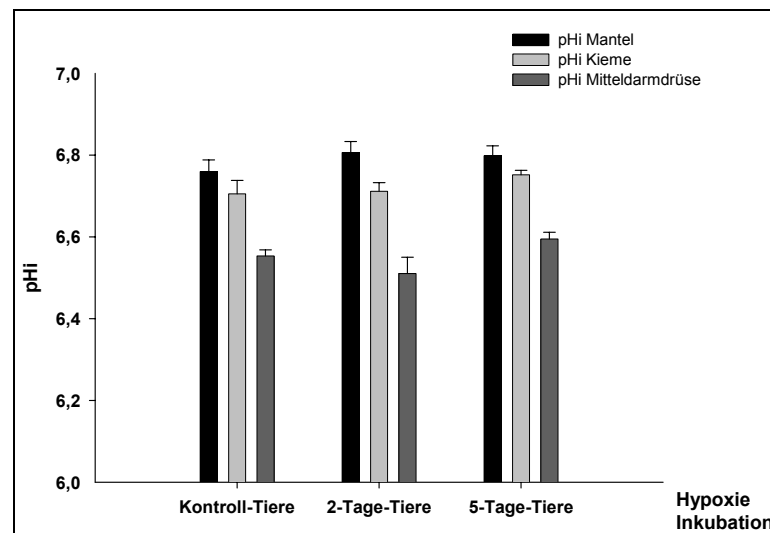


Abb. 3.1-1: *Arctica islandica*. pHi-Werte in den drei Geweben, Mantel, Kieme und Mitteldarmdrüse. Werte in MW ± STF; n = 3

Folglich wurde für jedes Gewebe ein mittlerer pHi-Wert aus den Werten der Kontrolltiere, der 2-Tage-Tiere und der 5-Tage-Tiere gebildet und als Grundlage für die Berechnung des zellulären Redox-Potentials verwendet (vergleiche Nernst-Gleichung in Material und Methoden).

Tab. 3.1-1: *Arctica islandica*. Gewebe-pHi in Kontrolltieren und unter Hypoxie. MW ± STF; n = 3

Gewebe	Mantel	Kieme	Mitteldarmdrüse
Kontrollen	6,760 ± 0,0287	6,705 ± 0,0328	6,554 ± 0,0145
2 Tage	6,806 ± 0,027	6,712 ± 0,0213	6,510 ± 0,0398
5 Tage	6,798 ± 0,0246	6,752 ± 0,0111	6,595 ± 0,0161

Die Proben für diese Messung stammten aus einem parallelen Hypoxie-Versuchsansatz mit Tieren derselben Population. Die Tiere wurden für zwei und fünf Tage bei 1-2% O₂-Sättigung inkubiert und die Gewebeproben anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2. Glutathionkonzentration und Redoxpotential in den unterschiedlichen Geweben der Islandmuschel unter Hypoxie

Veränderungen des zellulären Redox-Milieus unter Hypoxie wurden über die Konzentrationen an reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion in den Geweben Mitteldarmdrüse, Kieme und Mantel von *A. islandica* untersucht.

Abb. 3.2-1 zeigt die Ergebnisse für die Mitteldarmdrüse. In diesem Gewebe nahm der Gesamtglutathiongehalt innerhalb einer Woche (168 Stunden) um 38,8% ab und war signifikant geringer als der Kontrollwert. Die Abnahme des Glutathiongehaltes kann größtenteils auf Veränderungen des GSH-Gehaltes zurückgeführt werden, der einen ähnlichen Verlauf zeigte und nach 1 Woche 53% geringer war als in den Kontrolltieren. Nach einer Abnahme innerhalb der ersten 12 Stunden Hypoxie (nicht signifikant) von $179,74 \pm 26,89$ nmol GSSG / FG auf $123,02 \pm 17,72$ nmol GSSG / FG stieg der GSSG-Gehalt wieder geringfügig an ($131,44 \pm 42,05$ nmol GSSG / FG nach 168 Stunden). Nach 48 Stunden Hypoxie war die Mitteldarmdrüse signifikant oxidiierter als nach 12 Stunden, was sich in einer Zunahme des Gehaltes an oxidiertem Glutathion zeigte (in Abb. 3.2-1 mit o gekennzeichnet).

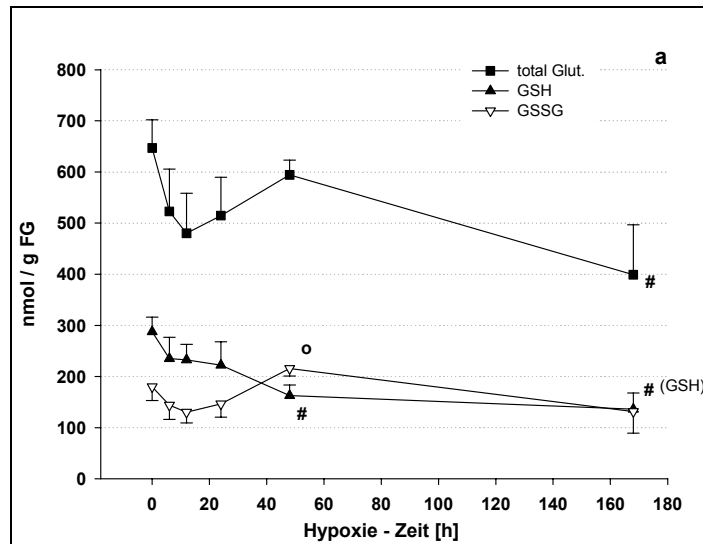


Abb. 3.2-1: *Arctica islandica*. Glutathiongehalt in der Mitteldarmdrüse nach unterschiedlich langen Hypoxie-Inkubationen. Werte in nmol / g FG als MW \pm STF; n = 3-8; # signifikant kleiner als Kontrolle, o signifikant höher als der 12 Stundenwert

Obwohl die Änderungen im GSSG/GSH-Verhältnis im Laufe der Hypoxie-Inkubationen nicht signifikant waren, stieg das Redoxpotential in der Mitteldarmdrüse während der Inkubation von $-289,42 \pm 3,48$ mV auf $-272,52 \pm 3,71$ mV (48 Stundenwert) und war damit signifikant oxidiert als in den normoxen Kontrolltieren (Abb. 3.2-2). Das Redoxpotential blieb mit $-275,38 \pm 7,57$ mV auch nach einer Woche Hypoxie auf diesem relativ oxidierten Level.

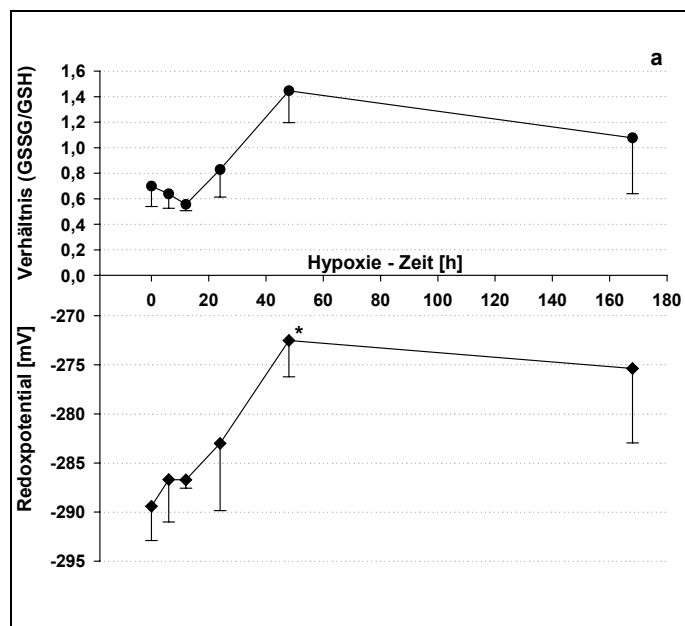


Abb. 3.2-2: *Arctica islandica*. Redoxverhältnis und Redoxpotential in der Mitteldarmdrüse nach unterschiedlich langen Hypoxie-Inkubationen. Werte in (GSSG/GSH) und mV als MW \pm STF; n = 3-8; * signifikant oxidiert als die Kontrolltiere

Der Glutathiongehalt (Gesamtglutathion, GSH sowie GSSG) im Mantelgewebe (Abb. 3.2-3) war deutlich geringer und lag in den Kontrollen bei etwa 30% der Glutathionkonzentration der Mitteldarmdrüse. Unter hypoxer Inkubation zeigten sich nur geringfügige nicht-signifikante Veränderungen. Der Anteil des oxidierten Glutathions machte $< 10\%$ des Gesamtglutathiongehaltes aus. Nach 2 Tagen hypoxer Inkubation war das Mantelgewebe deutlich oxidiert als in den Kontrolltieren (Abb. 3.2-4, (GSSG:GSH) und Redoxpot.). Der Anstieg des Redoxpotentials während der ersten 24 Stunden auf einen Maximumwert von $-313,13 \pm 5,56$ mV war jedoch nicht signifikant und ist auf einen Anstieg des oxidierten Glutathions (39,9%) und einer Abnahme der reduzierten Form GSH zurückzuführen. Nach 168 Stunden waren sowohl der Glutathion-Status (GSSG:GSH) als auch das Redoxpotential im Mantelgewebe wieder wie in den Kontrolltieren, bzw. leicht reduziert.

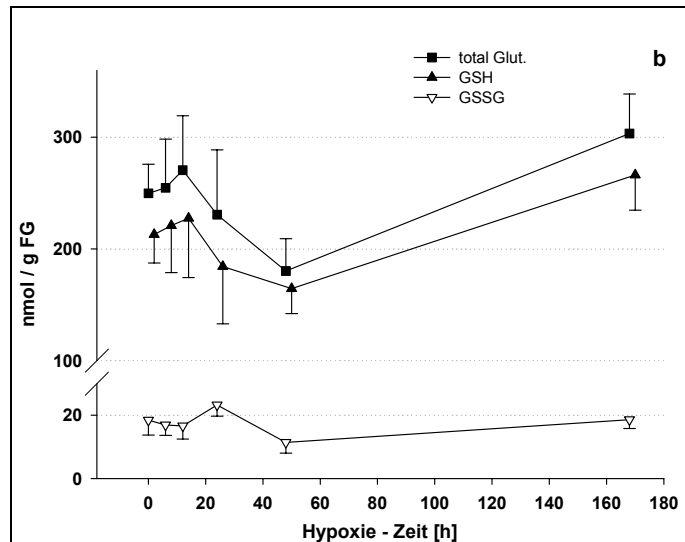


Abb. 3.2-3: *Arctica islandica*. Glutathiongehalt im Mantel nach unterschiedlich langen Hypoxie-Inkubationen. Werte in nmol / g FG als MW \pm STF; n = 4-7

Ähnlich wie der Gehalt an GSH und GSSG zeigte das Redoxpotential im Mantel keine signifikanten Veränderungen (Abb. 3.2-4) über den gesamten Zeitraum der Hypoxie.

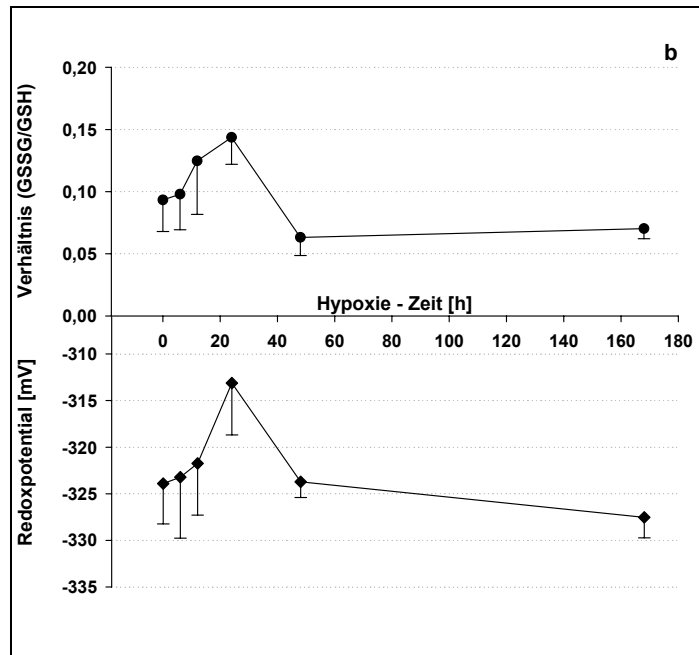


Abb. 3.2-4: *Arctica islandica*. Redoxverhältnis und Redoxpotential im Mantel nach unterschiedlich langen Hypoxie-Inkubationen. Werte in (GSSG/GSH) und mV als MW \pm STF; n = 4-7

Die Glutathionwerte im Kiemengewebe zeigten aufgrund der hohen individuellen Variabilität und den daraus resultierenden Standardfehlern keinen signifikanten Trend. In den Kontrollen lag der GSSG-Gehalt bei 22% des GSH-Gehaltes, der zweimal innerhalb einer Woche Hypoxie im Vergleich zu den Kontrollen signifikant abnahm (Abb. 3.2-5). Diese signifikanten Abnahmen hatten auch Einfluss auf die Entwicklung des Gesamtglutathiongehaltes der sich dadurch ebenfalls signifikant veränderte (12 Stunden).

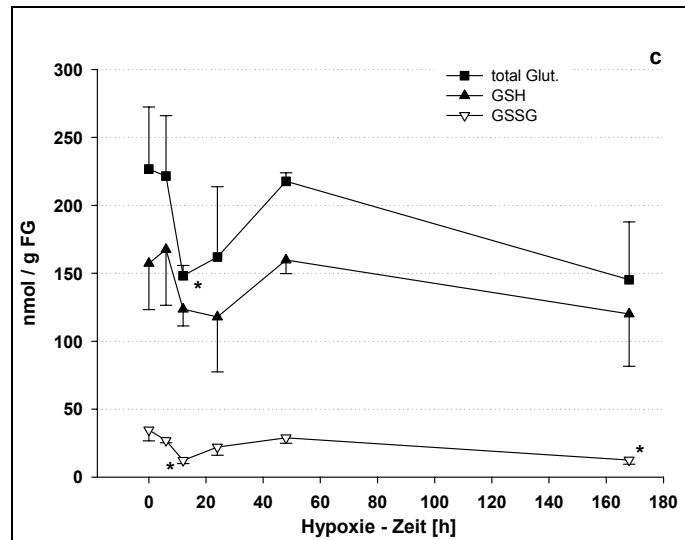


Abb. 3.2-5: *Arctica islandica*. Glutathiongehalt in der Kieme nach unterschiedlich langen Hypoxie-Inkubationen. Werte in nmol / g FG als MW \pm STF; n = 2-7; * signifikant geringer als Kontrollwerte

Entsprechend nahm das GSSG/GSH-Verhältnis (Glutathion-Status) während der Hypoxie-Inkubation ab, und das Kiemengewebe wurde zunehmend reduziert. Das Redoxpotential zeigte keine signifikanten Veränderungen im zellulären Milieu der Kieme ($-306,94 \pm 2,45$ mV in den Kontrollen, $-305,05 \pm 8,06$ mV nach 168 Stunden) über den gesamten Hypoxie-Zeitraum.

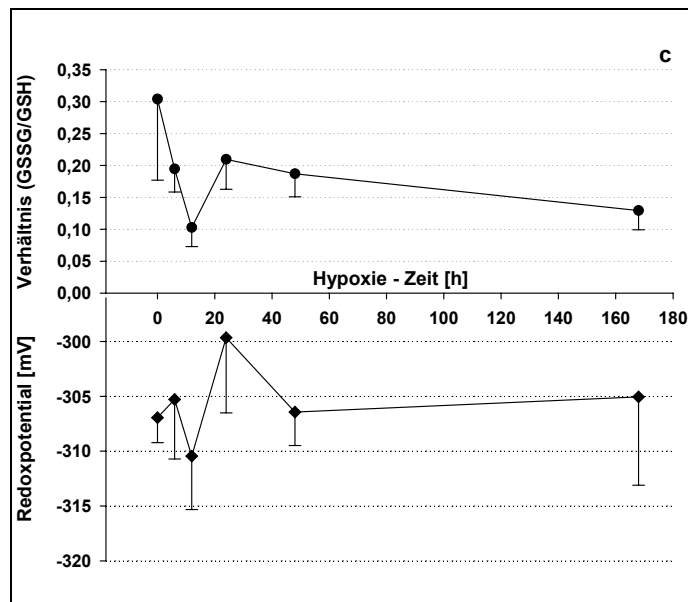


Abb. 3.2-6: *Arctica islandica*. Redoxverhältnis und Redoxpotential in der Kieme nach unterschiedlich langen Hypoxie-Inkubationen. Werte in (GSSG/GSH) und mV als MW \pm STF; n = 2-7

3.3. Vergleich zwischen den Geweben Mitteldarmdrüse, Kieme und Mantel bezüglich des Glutathiongehaltes und des Redoxpotentials

Ein Vergleich des Glutathion-Gesamtgehaltes in den drei untersuchten Organen der Islandmuschel über den gesamten Hypoxie-Zeitraum ergab den höchsten Glutathiongehalt in der Mitteldarmdrüse (Abb. 3.3-1).

Die Mitteldarmdrüse der Kontrolltiere wies in etwa einen dreifachen Glutathiongehalt zu den beiden anderen Geweben auf. Während der Gesamtglutathiongehalt im Mantelgewebe im Verlauf der Inkubationszeit keine signifikanten Veränderungen zeigte und weitgehend konstant blieb, nahm er in der Mitteldarmdrüse in dieser Zeit um 38% ab und war nach 1 Woche signifikant geringer als in den Kontrollen. In der Kieme nahm der Glutathiongehalt, ebenfalls signifikant, nach 12 Stunden um 35% ab. Auf diesen Wert pendelte sich der Glutathiongehalt auch nach einer Woche wieder ein, nachdem er nach 48 Stunden angestiegen war.

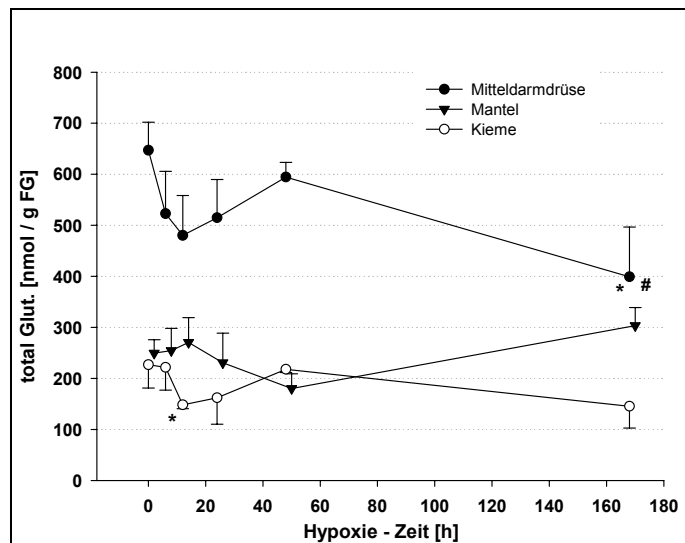


Abb. 3.3-1: *Arctica islandica*. Gesamtglutathiongehalt in Mantel, Kieme und Mitteldarmdrüse nach unterschiedlich langen Hypoxie-Inkubationen. Werte in nmol / g FG als MW \pm STF; n = 2-8;

kein signifikanter Unterschied zwischen Mitteldarmdrüse und Mantel;

* signifikanter Unterschied zu den Kontrollen

Außerdem zeigte die Mitteldarmdrüse im Gegensatz zu den anderen Geweben ein stärker oxidiertes zelluläres Redoxmilieu im Verlauf der hypoxen Inkubation. Kieme und Mantel blieben während der Hypoxie reduzierter als die Mitteldarmdrüse (Abb. 3.3-2) und blieben trotz nicht-signifikanter Veränderungen auf diesem reduzierten Niveau. Im Vergleich zu den anderen Geweben war der Mantel über den ganzen

Versuch auch in der Kontrolle $M = -323,9 \pm 4,34$ mV; $M_i = -289,42$ mV $\pm 3,48$; $K = -306,94$ mV $\pm 2,45$ das reduzierteste Gewebe.

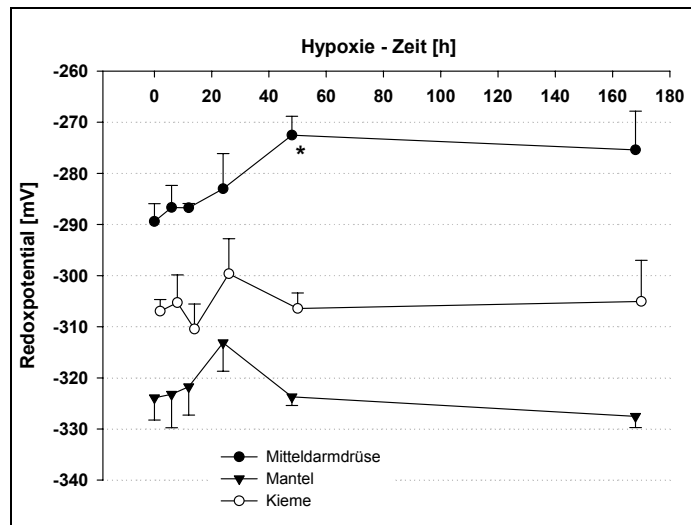


Abb. 3.3-2: *Arctica islandica*. Redoxpotential in Mantel, Kieme und Mitteldarmdrüse nach unterschiedlich langen Hypoxie-Inkubationen. Werte in mV als MW \pm STF; n = 2-8; * signifikant höher als der Kontrollwert der Mitteldarmdrüse

3.4. RNA-Isolation

Zur Bestimmung von "Vollängen – mRNA" und für Expressionsstudien ist RNA von hoher Reinheit und Integrität Grundvoraussetzung. Um dies zu erreichen, musste die RNA-Isolierung aus der Islandmuschel *Arctica islandica* als Teil dieser Diplomarbeit optimiert werden.

Auf Grund von Vorerfahrungen mit Muschelgewebe (Lüdeking pers. Mitteilung; Butler & Roesijadi, 2001; Rhodes & Van Beneden, 1997) wurde eine auf Phenol basierende Methode (TRIzol[®]) für die Isolierung der RNA verwendet.

Die zwei Abbildungen (Abb. 3.4-1 und Abb. 3.4-2) zeigen die Optimierung der RNA-Isolierung aus der Islandmuschel *Arctica islandica*. Alle RNA-Proben hatten ein $OD_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,1. Die RNA war demnach relativ rein von Protein- und Phenolverunreinigungen.

Abb. 3.4-1 zeigt das Ergebnis der Standard-TRIfast-Methode, auch eine Phenol-Methode. Die 18S rRNA ist deutlich bei 1,5-2 kb zu erkennen, während die 4 kb große 28S rRNA fehlt. Das Fehlen der 28S rRNA deutet auf eine schlechte Integrität der RNA insgesamt hin, was auf unzureichende Isolierung der größeren RNAs oder einen Abbau der isolierten RNA durch nicht vollständig entfernte RNasen hinweist. Für einen RNA-Abbau spricht auch die diffuse Färbung unterhalb der 18S-Bande. Eine RNA-Isolierung

mit TRIfast nach dem Standard-Protokoll erwies sich damit als ungeeignet für *Arctica*-Gewebe.

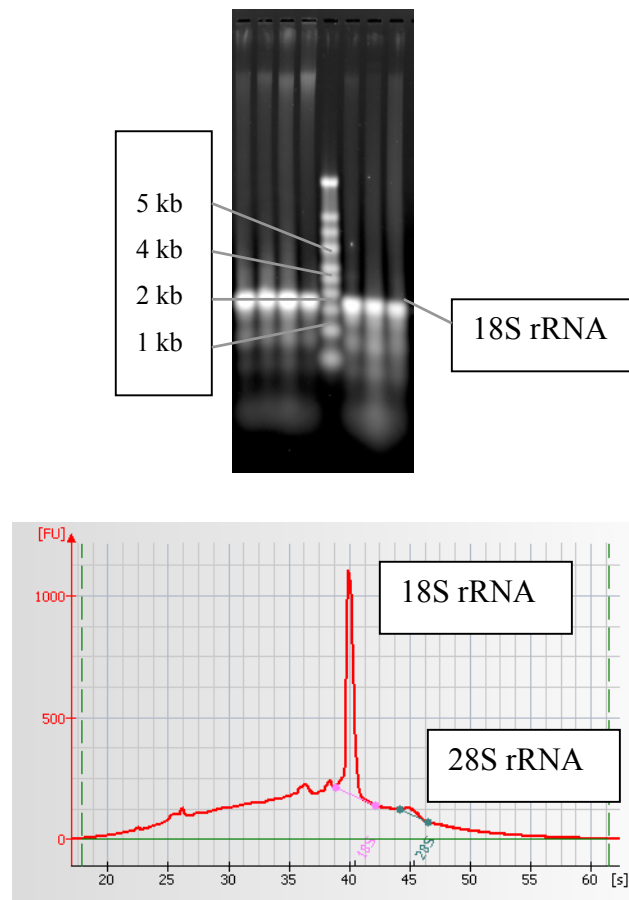


Abb. 3.4-1: Ergebnis der RNA-Isolierung mit der Standard TRIfast-Methode. In dem oberen Gelbild ist die 18S rRNA deutlich bei 1,5-2 kb zu erkennen, während die 28S rRNA nicht vorhanden ist. Das untere Bild zeigt ein Elektropherogramm, in dem der 18S rRNA Peak bei 40 s, ein ganz leichter 28S rRNA Peak bei 45 s und eine Art Berg vor den Peaks, der auf Verunreinigungen schließen lässt, deutlich zu sehen sind.

Da die Isolierung mit TRIfast nicht zu dem gewünschten Ergebnis führte, wurde TRIzol[®], eine andere Phenollösung, verwendet (2.3.2).

Um die so isolierte RNA auf DNA-Kontaminationen zu testen, wurden RNA und zur Kontrolle cDNA in eine PCR eingesetzt (ohne Abbildung). Die Entstehung von Produkten aus der RNA in der PCR zeigte, dass die RNA noch mit DNA kontaminiert war. Deshalb wurde ein DNA-Verdauungsschritt an die RNA-Isolierung angeschlossen. Das entgültig erarbeitete Protokoll richtete sich im Wesentlichen nach den Anweisungen der Hersteller mit folgenden Veränderungen: 100 mg Gewebe (FG) wurden mit 2-3 ml TRIzol[®] aufgeschlossen, zusätzlich wurde ein Gewebeaufschluß mit einem Ultrathurax durchgeführt. Das resultierende Homogenat wurde eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert, und nicht wie vom Hersteller vorgeschlagen sofort weiterverarbeitet (vergleiche Material und Methoden). Das Ergebnis ist in Abb. 3.4-2 zu sehen, sowohl in dem RNA-Gel als auch in dem Elektropherogramm sind die 18S rRNA und die 28S rRNA deutlich zu erkennen.

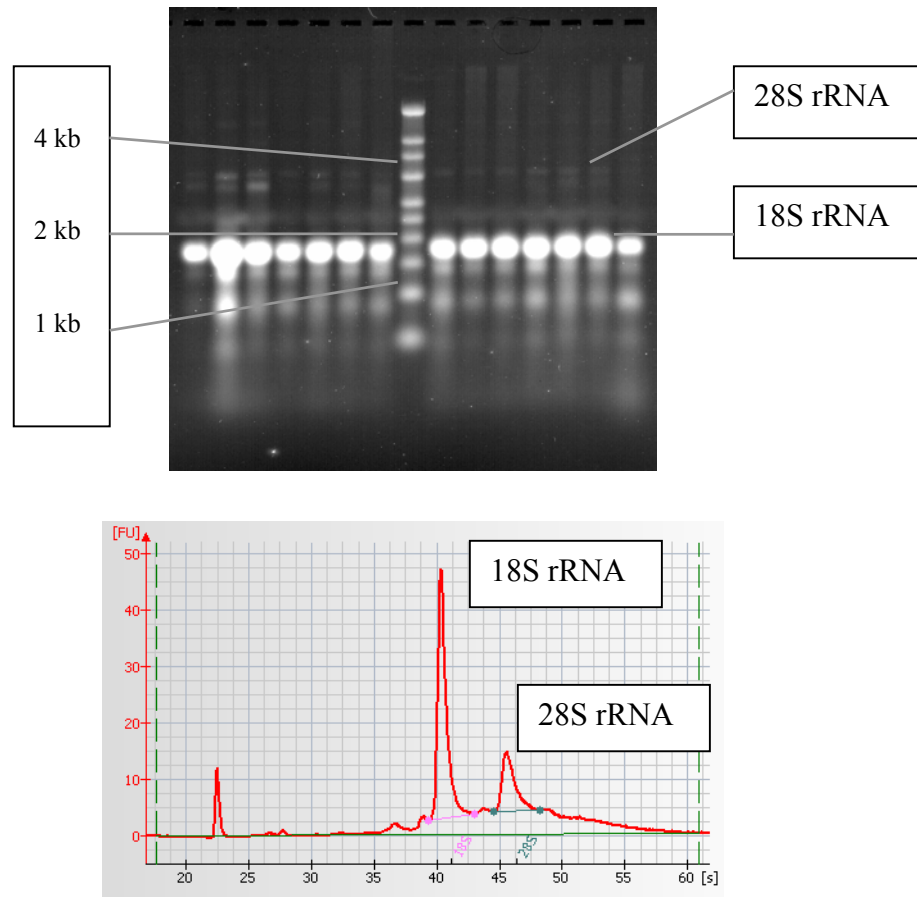


Abb. 3.4-2: RNA mit der endgültige Methode isoliert. Oben das RNA-Agarose-Gel und unten das Elektropherogramm. In beiden sind sowohl die 18s rRNA als auch die 28S rRNA zu sehen.

RNAlater und RNAlater Ice sind Substanzen, die RNasen inhibieren. Das Gewebe wird vor dem Homogenisieren in ihnen inkubiert, damit das Reagenz in das Gewebe eindringen und die natürlich vorkommenden RNasen hemmen kann. Im Laufe der Arbeit hat sich allerdings gezeigt, dass die Verwendung dieser Substanzen nicht notwendig ist. Zumal das Phenol in der TRIzol[®]-Lösung die RNasen hemmt (Angabe des Herstellers). Mit der endgültigen Isoliermethode werden gute RNA-Qualitäten ohne die Verwendung von RNAlater erzielt (siehe Material und Methoden).

Ein Nachteil der phenolischen RNA-Extraktion ist der hohe Gehalt an niedermolekularen Bestandteilen, wie Polysacchariden, und DNA. Dies erklärt auch, warum die Absorption bei 260 nm nach dem DNA-Verdau und der zusätzlichen Aufreinigung über das RNeasy-Kit stark abnimmt. Nach der Aufreinigung waren nur

noch 13-75% der scheinbaren RNA-Menge vorhanden. DNA und RNA haben bei der gleichen Wellenlänge, 260 nm, ihr Absorptionsmaximum, bei dem auch Polysaccharide absorbieren. Folglich können mit dieser Methode Polysaccharide und DNA nicht von RNA unterschieden werden. Allerdings hat sich auch in der Kapillarelektrophorese gezeigt, dass der RNA-Gehalt abgenommen hat.

Mit der optimierten Isolationsmethode konnte Gesamt-RNA isoliert werden, die eine schwache, aber deutliche 28S rRNA Bande enthält.

Verglichen mit Gesamt-RNA aus Vertebraten wie z.B. Fischen ist diese Bande allerdings deutlich schwächer. Auf Grund der Stöchiometrie von 1:1 (18S:28S in den Ribosomen) sollte die 28S rRNA aufgrund ihrer höheren Masse deutlich hellere Banden erbringen, wenn sie intakt isoliert wird. Aus der zum gegenwärtigen Zeitpunkt vorliegenden RNA konnten jedoch bereits spezifische cDNA-Fragmente für verschiedene Gene isoliert werden (siehe unten).

Tab. 3.4-1: Es wurde RNA aus vier unterschiedlichen Geweben der Muschel isoliert.

Gewebe	RNA-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{mg}$ FG]	Gesamt-RNA [μg] im Gewebe	
Mitteldarmdrüse	2,07	186,3	gut zu homogenisieren, geringe Gewebemenge
Fuß	—	—	fester Muskel, ließ sich nicht schnell genug homogenisieren
Kieme	0,47	61,1	Gewebe ging leicht verloren
Mantel	0,22	66	viel Gewebe zur Verfügung

Die Kieme ist mit einem Bakterien-Biofilm überzogen, weshalb ein Eintrag von Fremd-RNA möglich ist. Die isolierten RNA-Mengen aus dem Frischgewebe liegen unter den Angaben im TRIzol[®]-Protokoll (Muskel = 1-1,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe; Leber = 6-10 $\mu\text{g}/\text{mg}$), welches für Wirbeltiergewebe ausgelegt ist. Man sieht hieran, dass *Arctica islandica* wesentlich weniger RNA aufweist als das Gewebe von Wirbeltieren. Außerdem zeigte sich, dass diese RNA während der Isolation einem erheblichen Abbau unterliegt

3.5. Referenzsonden

Für spätere Expressionsstudien und um die verwendeten Methoden auf ihre Anwendbarkeit für Muschelgewebe zu überprüfen, wurden zwei Referenzsonden isoliert: die auf alle Fälle vorhandene 18S rRNA, die schon in den Gelen sichtbar war, und ein Actin-Fragment. Die 18S rRNA-Sequenz von *A. islandica* ist bereits

veröffentlicht, so dass diese Sequenz als Vorlage für die hier verwendeten Primer gedient hat. Actin gehört zu den kontinuierlich exprimierten Genen und seine mRNA liegt in Muskelzellen in großen Mengen vor. Die Sequenz lässt sich daher leichter ermitteln als die Sequenz einer Transkriptionsfaktor-mRNA.

3.5.1. 18S rRNA

Aus der gereinigten RNA konnte mit dem Primerpaar Ai18S-B4 – Ai18S-F3 (siehe Tab. 2.3.6-1) ein 244 bp großes Fragment der 18S rRNA isoliert werden.

Der gefundene 18S rRNA Sequenzabschnitt wurde mit Hilfe des Clustal W Programms von Mac Vector 7.2 mit den veröffentlichten Sequenzen von *Arctica islandica* (U 93555), *Mya arenaria* (AF 120560) und *Glossus humanus* (AY 070119) verglichen (Abb. 3.5.1-1)

Dabei zeigte sich, dass die neu isolierte *Arctica islandica*-Sequenz stärker mit denen der beiden anderen Muscheln übereinstimmt als mit der bereits veröffentlichten *A. islandica*-Sequenz. Diese weist drei Leerstellen (in Abb. 3.5.1-1 rot unterlegt) auf, die die anderen Sequenzen nicht haben. Die neu bestimmte Sequenz weist zu *Mya arenaria* sieben und zu *Glossus humanus* nur einen Nukleotid-Unterschied auf (blau gekennzeichnet).

	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Ai 18S rRNA neu	TGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCGGGCGGCCGGAACGTTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCCTTTGC								G
Ai 18S rRNA publ.	TGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCGGGCGGCCGGAACGTTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCCTTTGC								-G
Ma 18S rRNA	TGGTGCTCTTGA	TGAGTGTCTCGGGCGGCCG	ACGTTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGC						TTGTCG
Gh 18S rRNA	TGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCGGGCGGCCGGAACGTTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCCTTTGC								G
consensus	TGGTGCTCTTGACTGAGTGTCTCGGGCGGCCGGAACGTTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCCTTTGC								G
		90	100	110	120	130	140	150	160
Ai 18S rRNA neu	CCTGCATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCGGAGCTC							GAGGTAATGATTA	
Ai 18S rRNA publ.	CCTGCATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCGGAGCTC							-AGGTAATGATTA	
Ma 18S rRNA	CCTGA	ATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTC						TTCGGAGCTC	GAGGTAATGATTA
Gh 18S rRNA	CCCGCATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCGGAGCTC							GAGGTAATGATTA	
consensus	CCTGCATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCGGAGCTC							GAGGTAATGATTA	
		170	180	190	200	210	220	230	240
Ai 18S rRNA neu	TAGGGACTGACGGGGGC	ATTTCGTATTGCGGGCTAGAGGTGAAATTC							TGGACCGTCGCAAGACGAACTACAGCGAAAGC
Ai 18S rRNA publ.	TAGGGACTGACGGGGG	-ATTTCGTATTGCGGGCTAGAGGTGAAATTC							TGGACCGTCGCAAGACGAACTACAGCGAAAGC
Ma 18S rRNA	TAGGGACTGACGGGGGC	ATTTCGTATTGCGGGCTAGAGGTGAAATTC							TGGACCGTCGCAAGACGAACTACAGCGAAAGC
Gh 18S rRNA	TAGGGACTGACGGGGGC	ATTTCGTATTGCGGGCTAGAGGTGAAATTC							TGGACCGTCGCAAGACGAACTACAGCGAAAGC
consensus	TAGGGACTGACGGGGGC	ATTTCGTATTGCGGGCTAGAGGTGAAATTC							TGGACCGTCGCAAGACGAACTACAGCGAAAGC
		250							
Ai 18S rRNA neu	ATTTGCC								
Ai 18S rRNA publ.	ATTTGCC								
Ma 18S rRNA	ATTTGCC								
Gh 18S rRNA	ATTTGCC								
consensus	ATTTGCC								

Abb. 3.5.1-1: Sequenzenabgleich eines Fragmentes der 18S rRNA. Es werden eine bereits veröffentlichte (publ.) (U93555), die neu sequenzierte, eine *Mya arenaria* (AF120560) und eine *Glossus humanus* (AY070119) Sequenz miteinander verglichen. Die Lücken der bereits veröffentlichten Sequenz sind rot unterlegt und die Unterschiede des neuen Fragmentes zu den beiden anderen Muscheln sind blau unterlegt.

Die Lücken bestehen nur in der bereits publizierten Sequenz, die Nukleotide der neu identifizierten Sequenz stimmen mit denen der anderen Muscheln überein. Das lässt darauf schließen, dass die publizierte Sequenz an diesen Stellen Fehler aufweist. Das neue Fragment weist Übereinstimmungen von 98-99% mit den beiden anderen Muscheln auf (Tab. 3.5.1-1).

Tab. 3.5.1-1: Identitäten der miteinander verglichenen 18S rRNA-Fragmente.

	<i>Mya arenaria</i>	<i>Glossus humanus</i>	<i>Arctica islandica</i> publ.
<i>Arctica islandica</i> neu	98%	99%	98%
<i>Arctica islandica</i> publ.	95%	97%	
<i>Glossus humanus</i>	96%		

3.5.2. Actin

Es konnten drei Actin-Fragmente, die sich teilweise überlappen, mit den Primerpaaren Mact-B2 – Mact-F1; Mact-B3 – Mact-F4; Mact-B8 – Mact-F4 isoliert werden. Die Klone weisen große Variationen auf, möglicherweise handelt es sich dabei um Isoformen.

Aus dem Sequenzenvergleich eines 789 bp langen Fragmentes, das in mehreren Klonen (z.B. Klon 144) identisch war, wurde eine Aminosäuresequenz abgeleitet. Dieser 262 Aminosäuren lange Abschnitt wurde mit den entsprechenden Sequenzen anderer Muschelarten verglichen (Abb. 3.5.2-1). Die von den betrachteten Arten zu *A. islandica* am nächsten verwandte *Dreissena polymorpha* weist vier unterschiedliche Aminosäuren auf (blau unterlegt). Die beiden Arten besitzen eine Identität von 97% und 99% Ähnlichkeit auf Proteinebene. Es fällt auf, dass sich viele der verglichenen Arten an drei Stellen voneinander unterscheiden (rot gekennzeichnet). Der Kabeljau, hier als Outgroup benutzt, hat zu den Muscheln Identitäten zwischen 78% und 83% auf Nukleotid- und 87-95% auf Aminosäureebene (Tab. 6-3).



Abb. 3.5.2-1: Vergleich eines 262 Aminosäure langen Actin-Fragmentes der Islandmuschel *Arctica islandica* (Ai) mit *Dreissena polymorpha* (Dp; AF082863), *Pecten maximus* (Pm; AF494455), *Crassostera viriginica* (Cv; X75894), *Crassostera gigas* (Cg; AF026063), *Mytilus galloprovincialis* (Mg; AF157491) und *Gadus morhua* (Gm; AF500273). Die Aminosäure-Unterschiede zwischen Ai und Dp sind blau gekennzeichnet und die zwischen Ai und Gm sind gelb unterlegt. Rot gekennzeichnet sind Aminosäuren, die sich bei vielen der verglichenen Arten unterscheiden.

In dem in Abb. 3.5.2-2 dargestellten Stammbaum, der sich aus dem Sequenzenvergleich ableitet, werden die verglichenen Arten nicht ihrer Phylogenie entsprechend gruppiert. So wird *D. polymorpha* den Austern zu geordnet statt der ihr näherverwandten *A. islandica* und der Kabeljau nicht als Outgroup behandelt.

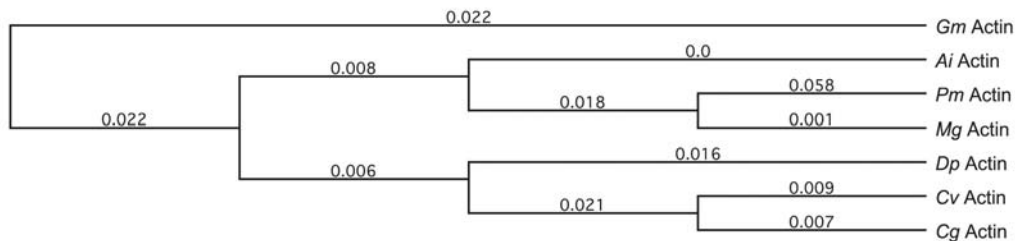


Abb. 3.5.2-2: Phylogenetische Analyse des 262 Aminosäure langen Actin-Fragmente der Islandmuschel *Arctica islandica* (Ai), der Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* (Dp; AF082863), der Pecten *Pecten maximus* (Pm; AF494455), der Austern *Crassostera virginica* (Cv; X75894) und *Crassostera gigas* (Cg; AF026063) sowie der *Mytilus galloprovincialis* (Mg; AF157491). Der Stammbaum wurde mit der Neighbour Joining Methode (Best Tree; Tie Breaking = Systematic; Distance: Poisson-correction; Gaps distributed proportionally) und mit dem Kabeljau *Gadus morhua* (Gm; AF500273) als Outgroup berechnet.

Die Islandmuschel weist zu den Austern (*Crassostera virginica* und *Crassostera gigas*) Identitäten von 84% und 83% auf Nukleotid- und 94% bzw. 95% auf Proteinebene auf, während sie zu *Pecten maximus* 92% und *Mytilus galloprovincialis* 95% Identität auf Proteinebene besitzt (Tab. 6-3).

3.5.3. HIF

Es wurden zwei Serien von Primern für die HIF-Sequenz hergestellt. Die ersten Primer wurden auf der Basis der bereits veröffentlichten Sequenzen von *C. elegans*, und dem Zebrafisch, *D. rerio*, hergestellt.

Für die zweiten Primer wurde eine unveröffentlichte HIF-Sequenz von *Daphnia magna* als Vorlage benutzt. Die Primer wurden aus möglichst konservierten Bereichen ausgewählt, um die Nukleotidabfolge möglichst eindeutig festlegen zu können, was sich angesichts des wenig-konservierten Gens als schwierig erwies.

Mit den durchgeführten PCRs konnte noch keine HIF-Sequenz amplifiziert werden. Fragmente, die in den Gelen die annähernd richtige Größe hatten, erwiesen sich als falsch-positive Klone.

4. Diskussion

Die Islandmuschel *Arctica islandica* ist mit einer maximalen Lebensspanne von bis zu 70 Jahren in der Ostseepopulation (Zettler et al., 2001) und über 300 Jahren, in Gebieten mit Salinitäten bis zu 36‰ (Schöne et al., 2003), eine sehr langlebige Art. Sie ist darüber hinaus bekannt für ihre extreme Toleranz gegenüber Langzeit-Anoxie (Oeschger, 1990). Ein charakteristisches Verhaltensmerkmal dieser Muschel ist eine Art selbst-induzierter Anaerobiose, bei der sich die Tiere ohne erkennbaren äußeren Trigger im Sediment vergraben und dabei eine drastische Reduktion ihres Stoffwechsels induzieren (Taylor, 1976). Obwohl die genaue Ursache dieses Verhaltens bisher noch ungeklärt ist, wird vermutet, dass das Zusammenspiel aus selbst-induzierter Anaerobiose und Reoxygenierung eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität bewirken könnte (Abele, 2002). Eine reduzierte Stoffwechselaktivität zusammen mit einer hohen antioxidativen Kapazität könnte wiederum eine wichtige Grundlage für die Langlebigkeit von *A. islandica* darstellen (siehe „rate of living theory“ von Raymond Pearl, 1928; Fleming et al., 1981). Ausgehend von dieser Hypothese, dass wiederholte Stoffwechselreduktion und anschließende Reaktivierung unter normoxen Bedingungen an der Sedimentoberfläche zur Induktion von antioxidativen Abwehrmechanismen führen, wurde in der vorliegenden Diplomarbeit die Auswirkung von Hypoxie auf das Redoxmilieu in verschiedenen Geweben der Islandmuschel *A. islandica* untersucht. Darüber hinaus war das zweite Ziel der Arbeit, die Funktion des Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktors HIF-1 an einer Tierart zu untersuchen, die das Leben unter Hypoxie quasi zu einer Lebensstrategie gemacht hat, in dem sie sich selbst-induziert hypoxen Verhältnissen aussetzt.

4.1. Auswirkung von Hypoxie auf *A. islandica*

4.1.1. Warum wurde *A. islandica* unter Hypoxie untersucht?

Arctica islandica ist für ihre extreme Anoxie-Toleranz bekannt, und dementsprechend beschreiben die in der Literatur bekannten Untersuchungen den Einfluss von vollständiger Sauerstoffabwesenheit. Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich insofern von bisherigen Studien, als dass Hypoxie bei 1-2% Sauerstoff betrachtet wird. Es handelt sich dabei um schwere Hypoxie und 1-2% Sauerstoff (< 3 kPa) unterschreiten den Wert, der für *A. islandica* als kritisch beschrieben wird (5,35-6,65 kPa) (Taylor & Brand, 1975). Das bedeutet, dass *A. islandica* unter diesen Bedingungen in ihrer

aeroben Kapazität eingeschränkt ist und daher Anaerobiose und/oder Reduktion der Stoffwechselrate induziert. Darüber hinaus war geplant, die HIF-1-Antwort von *A. islandica* zu untersuchen. Von Arbeiten an verschiedenen Modellorganismen wie Säugern ist bekannt, dass die maximale HIF-1-Antwort bei 0.5% Sauerstoff induziert wird und bei noch niedrigerem PO₂ absinkt (Stroka et al., 2001). Bei den im Vergleich zu Säugern wesentlich Hypoxie-toleranteren Fischen wird eine maximale HIF-1-Antwort sogar bei noch höheren Sauerstoffkonzentrationen von 5% beobachtet (Soitamo et al., 2001). Man kann daher vermuten, dass HIF-1 eher einen Regulator unter Sauerstoffmangelbedingungen als unter Anoxie darstellt (Schroedl et al., 2002)

4.1.2. Vergleich der verschiedenen Gewebe Mitteldarmdrüse, Kieme und Mantel von *A. islandica* unter normoxen Kontrollbedingungen

Zunächst sollen die drei untersuchten Gewebe Mitteldarmdrüse, Kieme und Mantel (Muskelgewebe) verglichen und die pHi-Werte sowie die Glutathion-Daten diskutiert werden.

4.1.2.1. Intrazellulärer pH-Wert (pHi)

Der intrazelluläre pH-Wert (pHi) wurde in den verschiedenen Geweben bestimmt, da er über die Nernst-Gleichung mit in die Berechnung des Redox-Potentials eingeht. Darüber hinaus ist der pHi auch ein wichtiger Indikator für das Einsetzen anaerober Energiegewinnung in der Zelle. Ein Vergleich der drei Gewebe von ungestressten *A. islandica* Kontrolltieren hat gezeigt, dass der pHi-Wert in der Mitteldarmdrüse ca. 0,2 Einheiten unter dem Wert in Kieme oder Mantel liegt (Abb. 3.1-1, Tab. 3.1-1). Eine Ursache hierfür kann in der Funktion der Mitteldarmdrüse liegen. In ihr werden Verdauungsenzyme wie Amylase und verschiedene Glykogenasen gebildet, deren pH-Optimum im sauren Bereich liegt.

4.1.2.2. Das Glutathion-System

Glutathion ist sowohl ein wichtiges niedermolekulares Antioxidants als auch ein Indikator für das zelluläre Redox-Milieu (Schafer & Buettner, 2001). Das Glutathion-Redoxpaar (GSSG/2GSH) ist ein Maß für das reduktive Potential in einer Zelle oder einem Organell. Die Mitteldarmdrüse von *A. islandica* Kontrolltieren zeigt einen etwa dreifach höheren Gesamtglutathiongehalt als Kieme und Mantel. Auch in verschiedenen anderen Muschelarten ist der Gesamtglutathiongehalt in der Mitteldarmdrüse am

höchsten (Tab. 4.1.2.2-1). Dieses Organ besitzt wahrscheinlich ein höheres endogenes Potential zur ROS-Bildung als Kiemen- oder Muskelgewebe (Mantel). Das liegt zum Teil am höheren Lipidgehalt der Mitteldarmdrüse, der Sauerstoffradikal-Kettenreaktionen begünstigt (Estevez et al., 2002). Darüber hinaus sind die Mitteldarmdrüse und der Verdauungstrakt generell Orte der Akkumulation und Entgiftung von Xenobiotika (Livingstone et al., 1992; Viarengo et al., 1995; Pena Lopez et al., 2002) und Schwermetallen (Ahn et al., 2002, Choi et al., 2003), d.h. von Substanzen, die pro-oxidative Prozesse begünstigen. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die Mitteldarmdrüse bei *A. islandica* ein wesentlich oxidierteres Redox-Potential aufweist als Kieme und Mantel (Abb. 3.3-2). Desweiteren wurden in der Mitteldarmdrüse bei vielen marinen Tieren neben einer höheren Glutathion-Konzentration auch wesentlich höhere Konzentrationen an antioxidativen Enzymen gefunden als in Kieme oder Muskelgewebe (Livingstone et al., 1990; Viarengo et al., 1995).

Tab. 4.1.2.2-1: Vergleich des Gesamtglutathiongehaltes (nmol / g FG) in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Bivalvia-Arten.

Spezies	Kieme	Mitteldarmdrüse	Mantel	
<i>Arctica islandica</i>	226	647	249	vorliegende Arbeit
<i>Mytilus edulis</i>	192	608	-	Canesi & Viarengo, 1997
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	308	964	-	Pena-Lopez et al. 2002
<i>Mya arenaria</i>	-	-	200 - 400	Philipp, 2005
<i>Laternula elliptica</i>	-	-	380 - 850	Philipp, 2005
<i>Adamussium colbecki</i>	182	1203	-	Viarengo et al., 1995
<i>Pecten jacobaeus</i>	276	1894	-	Viarengo et al., 1995

Entsprechend der Hypothese von Abele (2002) kann vermutet werden, dass *A. islandica* eine hohe antioxidative Kapazität aufweist oder diese unter Hypoxie steigern kann (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). Aus Tab. 4.1.2.2-1 geht für die normoxen Kontrolltiere hervor, dass der Gesamtglutathiongehalt von *A. islandica* in allen drei untersuchten Geweben im selben Konzentrationsbereich liegt wie der anderer weniger Hypoxie-toleranter Muschelarten (180-1900 nmol / g FG). Das lässt darauf schließen, dass das Redoxmilieu in der Muschel unter normoxen Bedingungen ohne eine Zunahme von Redoxäquivalenten aufrechterhalten werden kann. Falls es durch die wiederholte Hypoxie-Exposition bei *A. islandica* zu einer Erhöhung der Sauerstoffradikalbildung kommen sollte, müssten die primären antioxidativen Abwehrmechanismen, wie die

niedermolekularen Antioxidantien Vitamin E oder C in einer größeren Konzentration vorliegen oder antioxidative Enzyme, welche für die Entgiftung eine größere Rolle spielen, eine erhöhte Aktivität zeigen. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht betrachtet. Für eine isländische Population konnte gezeigt werden, dass *A. islandica* eine sehr hohe Aktivität des H₂O₂-abbauenden Enzyms Katalase und der Superoxid-Dismutase aufweist (Julia Strahl, Eva Philipp, Doris Abele unveröffentlichte Daten). So ist die Katalaseaktivität im Mantel von *A. islandica* zehnmal so hoch wie im Mantel von *Mya arenaria* (Philipp et al., 2005).

4.1.2.3. Hypoxie-Antwort von *A. islandica*

4.1.2.3.1. Der intrazelluläre pH-Wert (pHi) als Indikator für Anaerobiose

Im Folgenden soll nun die Antwort von *A. islandica* auf bis zu eine Woche Hypoxie bei 1-2% Sauerstoff diskutiert werden.

Die Antwort Hypoxie-toleranter Tiere auf Sauerstoffmangel ist v.a. durch zwei Prozesse charakterisiert: Eine drastische Reduktion des Stoff- und Energieumsatzes und eine Aktivierung verschiedener anaerober Stoffwechselwege (Hochachka & Lutz, 2001). Während der Anaerobiose erfolgt unter Verbrauch von NADH+H⁺ v.a. innerhalb der ersten 48 Stunden ein verstärkter Abbau von freien Aminosäuren (z.B. Aspartat) zu Malat sowie eine Transaminierung des aus der Glykolyse stammenden Pyruvats zu Alanin (Grieshaber et al., 1994). Malat entsteht zusätzlich aus Glykogen und kann bei ausreichend vorhandenem NADH+H⁺ weiter zu Fumarat und Succinat reduziert werden (Grieshaber et al., 1994). Insgesamt bewirkt die Akkumulation saurer Endprodukte eine Absenkung des intrazellulären pH-Wertes. Bei *A. islandica* wurde innerhalb von 5 Tagen Anoxie eine signifikante Zunahme der anaeroben Endprodukte Succinat, Acetat, Propionat und Alanin nachgewiesen. Alle anaeroben Endprodukte wurden in den ersten 5 Tagen der Inkubation nicht im Inkubationswasser nachgewiesen, sondern verblieben im Gewebe (Oeschger, 1990). Während sich Succinat und Alanin auch weiterhin im Gewebe anreichern, können Propionat und Acetat an die Umgebung abgegeben werden und waren nach 20 Tagen Anoxie im Inkubationswasser nachweisbar. Dies wirkt einer übermäßigen Ansäuerung des intrazellulären Milieus entgegen (Oeschger, 1990). Darüber hinaus kann *A. islandica* durch das Lösen von Carbonaten aus der Schale einem Absinken des pHi aufgrund von Succinat-Alanin-Akkumulation entgegenwirken. In der vorliegenden Arbeit wurden keine anaeroben Metabolite bestimmt. Ein unveränderter pHi in allen drei untersuchten Geweben selbst nach 5tägiger Hypoxie

(Abb. 3.1-1), sowie eine unveränderte Dichte der Muschelschalen (Kontrolltiere: $0,39 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$; nach 1 Woche Hypoxie: $0,46 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$) lassen jedoch vermuten, dass innerhalb 1 Woche unter Hypoxie bei 1-2% O_2 keine messbare anaerobe Energiegewinnung induziert wird. Anders als unter komplett anoxen Bedingungen scheint *A. islandica* möglicherweise unter Hypoxie überwiegend auf die Strategie der Stoffwechselreduktion zurückgreifen zu können. Der pHi-Wert allein ist hier jedoch noch kein hinreichender Nachweis. Um wirklich einen Unterschied zwischen Anoxie- und Hypoxie-Antwort bei den Tieren nachweisen zu können, müssten wiederum alle anaeroben Metabolite und die Stoffwechselrate über die direkte Kalorimetrie untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der pHi jedoch hauptsächlich untersucht, um damit das Redoxpotential in den Geweben der Muscheln berechnen zu können.

4.1.2.3.2. Das Glutathion-System als Indikator für antioxidative Kapazität und intrazelluläres Redox-Potential

Eine bei Hypoxie-toleranten Tieren (z.B. gefriertolerante Schlangen, Frösche und Insektenlarven, tauchende Robben und Schildkröten und Schnecken im Trockenschlaf, Estivation) häufig beobachtete Antwort auf die Absenkung der Stoffwechselrate ist eine Steigerung der antioxidativen Kapazität, um einen bei der Reaktivierung des Stoffwechsels zu erwartenden Anstieg der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu kompensieren (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). In dieser Reaktivierungsphase kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstofftransport und -verbrauch in den Tieren und damit zu Hypoxie und anschließender Reoxygenierung. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch auch nach 168 Stunden (1 Woche) Hypoxie bei 1-2% O_2 in keinem der drei Gewebe eine Erhöhung der Gesamtglutathion-Konzentration festgestellt werden (Abb. 3.3-1). Auch hierbei ist es denkbar, dass die Konzentrationen anderer Antioxidantien oder die Aktivität antioxidativer Enzyme erhöht war, welche nicht bestimmt wurden.

In der Mitteldarmdrüse war der Gesamtglutathiongehalt nach 1 Woche Hypoxie signifikant reduziert gegenüber den Werten der Kontrolltiere. In Vertebraten ist die Leber das wichtigste Organ sowohl für die Synthese als auch den Export von GSH über die Blutbahn zu anderen Organen (Schafer & Buettner, 2001). Unter der Annahme, dass die Mitteldarmdrüse in Mollusken eine ähnliche Funktion im Glutathion-Metabolismus erfüllt, könnte eine Abnahme im Gesamtglutathion und GSH-Gehalt in der Mitteldarmdrüse innerhalb der ersten 12 Stunden Hypoxie (Abb. 3.2-1) zusammen mit

einem Anstieg beider Parameter im Mantel innerhalb desselben Zeitraumes auch auf eine Umverteilung des Glutathions zwischen verschiedenen Organen von *A. islandica* hindeuten. Allerdings ist fraglich, ob über das offene Kreislaufsystem der Muscheln ein solcher gerichteter Stofftransport möglich ist.

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene Reduktion der Stoffwechselrate könnte ebenfalls eine Ursache für eine geringere Produktionsrate des Tripeptids Glutathion darstellen und damit die generelle Abnahme im Gesamtglutathiongehalt in der Mitteldarmdrüse innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes erklären. Andererseits ist jedoch bekannt, dass die antioxidative Kapazität in Hypoxie-toleranten Tieren gesteigert werden kann, obwohl der Stoff- und Energieumsatz insgesamt stark herabgesetzt ist (Hermes-Lima, 2004). Demnach lassen diese Ergebnisse vermuten, dass das Glutathion-System in *A. islandica* eine eher untergeordnete Rolle als Antioxidans spielt.

Wahrscheinlich besitzen diese Tiere andere stärker wirkende Antioxidantien und nutzen das Glutathion möglicherweise im Wesentlichen, um den Redoxstatus der Gewebe auf einem konstanten Niveau zu halten.

Unter Hypoxie, d.h. unter verringerter Sauerstoffverfügbarkeit, ist die Umsetzung des Sauerstoffs in den Mitochondrien verringert, wodurch in der Zelle weniger Sauerstoffradikale freigesetzt werden (Halliwell & Gutteridge, 1999). Es ist daher zu erwarten, dass im Laufe einer hypoxen Inkubation das zelluläre Redox-Potential reduzierter, d.h. stärker negativ wird.

In der vorliegenden Hypoxie-Inkubation von *A. islandica* hat sich jedoch herausgestellt, dass das Redox-Milieu in der Mitteldarmdrüse innerhalb der ersten 48 Stunden Hypoxie weniger negativ, d.h. stärker oxidiert wurde. Dieses stärker oxidierte Redox-Milieu blieb über den weiteren Verlauf der Hypoxie-Inkubation konstant. Eine ähnliche Oxidation des Redoxmilieus war in Mantel und Kieme innerhalb der ersten 24 Stunden Hypoxie zu beobachten. Hier sank das Redoxmilieu jedoch bei länger anhaltender Hypoxie nach 24 Stunden wieder auf das Niveau der ungestressten Kontrolltiere. Dieses zunächst überraschende Ergebnis spricht für einen geringfügigen Anstieg des oxidativen Stresses, d.h. ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Prozessen, unter Hypoxie (Sies, 1985). Nach Untersuchungen von Chandel und Schumacker (Chandel et al., 1997, 1998, 2000, Übersichtsartikel Chandel & Schumacker, 2000) kann auch unter Sauerstoffmangelbedingungen die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch die in der mitochondrialen Elektronentransportkette akkumulierten Elektronen über die Verhältnisse unter normoxen Bedingungen hinaus gesteigert werden. Dieses Ergebnis

aus der Gruppe von Schumacker wird allgemein sehr angezweifelt und auch für *A. islandica* muss erst noch gezeigt werden, dass die leichte Oxidierung des zellulären Redoxmilieus unter Hypoxie tatsächlich durch hypoxe Sauerstoffradikalproduktion erfolgen kann und über welche Prozesse diese ROS gebildet werden würden. Auch Storey (1996) bezweifelt einen Anstieg im oxidativen Stress unter Sauerstoffmangelbedingungen in Hypoxie-toleranten Tieren. Er hält es für wahrscheinlicher, dass unter Hypoxie die Rückführung des GSSG zu GSH durch die Glutathion-Reduktase, aufgrund einer verminderten NADPH-Verfügbarkeit während der reduzierten Stoffwechselaktivität, limitiert ist. Bei *Littorina littorea* bewirkten 6 Tage Anoxie eine verringerte Glutathion-Reduktase-Aktivität in der Mitteldarmdrüse (Pannunzio & Storey, 1998). Beim Wattwurm *Arenicola marina* konnte gezeigt werden, dass bereits 5 Stunden hypoxe Inkubation zu einer reduzierten Glutathion-Reduktase-Aktivität im Chloragog-Drüsengewebe führen (Abele-Oeschger & Oeschger, 1995). Auf ähnliche Weise könnte also auch in der Mitteldarmdrüse von *A. islandica* eine unzureichende Reduktion zu GSH für den erhöhten GSSG-Gehalt nach 48 Stunden Hypoxie (Abb. 3.2-1) und damit für das stärker oxidierte Redox-Potential (Abb. 3.2-2) verantwortlich sein.

4.1.2.3.3. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 als Indikator für Sauerstoff-abhängige Genexpression

In Hypoxie-sensitiven Organismen wie den meisten untersuchten Säugern (von Mäusen bis Menschen) stellt die durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 induzierte Genexpression eine der wichtigsten physiologischen Antworten auf Sauerstoffmangel dar (Semenza, 2004). In der Gesamtheit führen die Zielgene von HIF-1 zu einer Verbesserung der Gewebedurchblutung, beeinflussen den Glukose- und Eisenmetabolismus und ermöglichen auf diese Weise ein Überleben des Organismus unter verminderter Sauerstoffverfügbarkeit (Semenza, 2002). Es stellt sich die Frage, ob die HIF-1-gesteuerte Genexpression auch in Hypoxie-toleranten Evertebraten eine Rolle spielt. Es wäre beispielsweise denkbar, dass HIF-1 bei diesen Tieren, ebenso wie in Säugern, glykolytische Enzyme induziert und so das Überleben unter langfristigem Sauerstoffmangel erleichtert. Dementsprechend könnte HIF-1 in Hypoxie-toleranten Evertebraten wie *A. islandica* auch eine Schlüsselfunktion für die Umorganisation des Stoffwechsels beim Einsetzen der selbst-induzierten Stoffwechselreduktion spielen. Dabei gilt jedoch zu bedenken, dass zahlreiche an der Hypoxie-induzierten Stoffwechselreduktion beteiligten Prozesse auch durch andere Transkriptionsfaktoren,

z.B. durch den Faktor AP-1, vermittelt werden (Hochachka & Lutz, 2001). In *Daphnia magna* wurde entdeckt, dass unter Hypoxie das Hämoglobin durch HIF-1 induziert wird. Da im Hämoglobinpromotor HIF-1 Bindungsstellen gefunden wurden (Gorr et al., 2004), könnte es sein, dass auch in *A. islandica* ein Zusammenhang zwischen HIF-1 und dem sich im Siphon befindlichen Hämoglobin besteht (Bunn & Poyton, 1996; Alyakrinskaya, 2003).

Da in der vorliegenden Diplomarbeit noch keine Untersuchungen zur HIF-1-abhängigen Genexpression durchgeführt werden konnten und selbst die Frage nach der Existenz von HIF-1 in *A. islandica* bisher ungeklärt bleibt, sind diese Überlegungen bis dato reine Spekulation.

4.2. Molekularbiologische Vorarbeiten für die Messung Hypoxie-induzierter Genexpression

Ursprüngliche Pläne dieser Arbeit sahen eine Untersuchung der HIF-1-Antwort bei *A. islandica* auf Expressionsebene (mRNA), Proteinebene und funktioneller Ebene (DNA Bindungsaktivität) vor. In einem ersten Schritt sollte zumindest ein Teil der Nukleotid-Sequenz von HIF-1 α , der sauerstoffregulierten HIF-1-Untereinheit über RT-PCR (RT = reverse Transkriptase) bestimmt werden. Diese Sequenz sollte anschließend als Sonde für Expressionsstudien verwendet werden. Zum anderen zeigt eine Sequenzbestimmung über RT-PCR, dass das gesuchte Gen konstitutiv (unter Kontrollbedingungen) exprimiert wird. Von diesem Vorhaben musste jedoch im Laufe dieser Arbeit Abstand genommen werden, da sich die Isolierung der für RT-PCR erforderlichen qualitativ hochwertigen RNA aus Evertebraten-Gewebe als schwierig erwies. Es wurde deutlich, dass bei Evertebraten-RNA klar zwischen der Reinheit – ausgedrückt durch die OD_{260/280} – und der Integrität – dem Vorhandensein der 18S rRNA und vor allem der 28S rRNA – unterschieden werden muss. Scheinbar können durch bekannte RNA-Isolationsmethoden Verunreinigungen durch z.B. Phenole und Proteine problemlos entfernt werden. Trotz einer guten Reinheit kann die Integrität jedoch von nicht ausreichender Qualität sein. Möglicherweise besitzen filtrierende Meeresorganismen wie *A. islandica* sehr resistente RNAsen, vielleicht als Schutz gegen eingestrudelte Pathogene. Möglich wäre auch, dass die RNA der Islandmuschel eine geringe Stabilität aufweist, wie sie auch bei anderen Evertebraten (Crustaceen) beobachtet wurde (K. Kerkoff, pers. Mitteilung).

Im Verlauf der Arbeit konnte die RNA-Isolierung aus dem Gewebe der Islandmuschel so weit optimiert werden (Abb. 3.4-2), dass Fragmente des Haushaltsgens Actin (Abb. 3.5.2-1), sowie der 18S rRNA (Abb. 3.5.1-1) über RT-PCR identifiziert werden konnten. Dies zeigt deutlich, dass die letztendlich isolierte RNA in ausreichender Qualität vorlag, um die RT-PCR Methode erfolgreich zur Isolierung und Charakterisierung in hoher Kopienzahl transkribierter Genfragmente (wie Actin und 18S rRNA) anwenden zu können. Darüber hinaus können die isolierten Sequenzen als Referenzsonden für zukünftige Expressionsstudien an *A. islandica* verwendet werden.

4.2.1. Vergleich der *A. islandica* Actin-Sequenzen mit denen anderer Muschelarten

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene Actin-Fragmente kloniert werden, die sich nicht zu einer gemeinsamen Consensus-Sequenz anordnen lassen. Daher könnte es sich dabei um verschiedene Actin-Isoformen handeln. Für genauere Aussagen ist jedoch eine Überarbeitung und Nachbestimmung der einzelnen Sequenzen erforderlich. Aus diesem Grunde wurde für den Vergleich von *A. islandica*-Actin mit Actin-Sequenzen anderer Muschelarten nur eine 789 bp Sequenz (Klon 144) ausgewählt (Abb. 3.5.2-1), die in mehreren Klonen identisch war. Als Outgroup (stammesgeschichtlich weit entfernte Vergleichsgruppe) für die phylogenetische Analyse wurde ein Actin-Fragment des Kabeljaus *Gadus morhua* verwendet. Eine genaue Betrachtung des Stammbaums (Abb. 3.5.2-2) zeigt, dass die der Islandmuschel phylogenetisch nahe stehende Dreikant- oder Zebromuschel (*Dreissena polymorpha*) der Gruppe der Austern zugeordnet wird. Dieser Abschnitt der Actin-Sequenz ist innerhalb der Muscheln sowohl auf Peptid- als auch auf Nukleotid-Ebene zu hoch konserviert, als dass Feinheiten der Bivalvia-Phylogenie aufgezeigt werden können. Auch die Sequenz des Kabeljaus hat eine zu hohe Übereinstimmung mit denen der verschiedenen Muschelarten, als dass sie als Outgroup dienen kann. Die Betrachtung der vollständigen Sequenz dagegen könnte dies bezüglich andere Ergebnisse liefern.

4.2.2. Vergleich der *A. islandica* 18S rRNA-Sequenz mit denen anderer Muschelarten

Der Vergleich des 18S rRNA-Fragmentes mit einer bereits veröffentlichten *A. islandica*-Sequenz (U 93555) und zwei weiteren Muschelfragmenten zeigt, dass die veröffentlichte Sequenz Lücken an Position 79, 147 und 177 des betrachteten Abschnittes (in Abb. 3.5.1-1 rot unterlegt) aufweist, während in den 18S rRNA

Sequenzen anderer Muscheln (*Mya arenaria* (AF 120560) und *Glossus humanus* (AY 070119)) an dieser Stelle die Nukleotide C, G und C zu finden sind. Die im Rahmen dieser Arbeit isolierte 18S rRNA Sequenz von *A. islandica* entspricht den Sequenzen aller übrigen bisher untersuchten Muscheln, weist also keine Lücken auf. Dies deutet auf einen Sequenzierfehler in der bereits veröffentlichten *A. islandica* 18s rRNA Sequenz hin.

4.2.3. Mögliche Gründe, weshalb bisher keine Sequenz-Bestimmung von HIF-1 α möglich war

Obwohl schließlich eine RNA von ausreichender Qualität isoliert werden konnte, wurde die gesuchte HIF-1 α -Sequenz bisher nicht über RT-PCR identifiziert.

Dies könnte zunächst einmal darauf hinweisen, dass das HIF-1 α Gen nicht im Genom von *A. islandica* vorhanden ist oder nicht konstitutiv exprimiert wird. Eine vollständige Abwesenheit des HIF-1 α Gens ist recht unwahrscheinlich, da es bisher in allen untersuchten Organismen gefunden wurde, was so verschiedenartige Gruppen wie Nematoden, Crustaceen, Fische und Säuger umfasst (Treinin et al., 2003; Nikinmaa, 2002; Ivan et al., 2001; Semanza, 2002; Soitamo et al., 2001). Auch die Schlussfolgerung, dass HIF-1 α nicht konstitutiv exprimiert wird, sondern die mRNA nur unter Hypoxie-Bedingungen induziert wird, erscheint wenig plausibel. Alle bisherigen Studien an verschiedenen Vertebraten haben ergeben, dass die Regulation von HIF-1 α posttranslational, durch den in Abschnitt 1.5 beschriebenen Sauerstoff-induzierten Abbauweg, erfolgt (Jaakkola et al., 2003). Sollte HIF-1 α bei *A. islandica*, anders als bisher bei Vertebraten beschrieben, nicht posttranslational, sondern auf Translationsebene reguliert werden, wäre auch eine im Vergleich zu Haushaltsgenen geringere mRNA-Stabilität (geringere Halbwertszeit) denkbar. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die mRNA eines Regulatorgens wie HIF-1 α in vergleichsweise geringeren Mengen exprimiert wird als die eines Haushaltsgens, wie z.B. des Actins (M. Lucassen, pers. Mitteilung), wodurch der Nachweis des ersteren erheblich erschwert werden würde.

Eine weitere Erklärung könnte ein Vergleich bisher bekannter Evertrebraten-Sequenzen des HIF-1 α Gens (*Caenorabditis elegans*, *Daphnia magna*, *Drosophila melanogaster*) liefern. Es zeigt sich, dass das Gen sowohl gegenüber bekannten Vertebratensequenzen als auch innerhalb der Evertrebraten nicht sehr gut konserviert ist. Dies erschwert die Konstruktion geeigneter Primer für die PCR erheblich. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wiesen zahlreiche Wobble-Positionen auf, waren also vermutlich

nicht ausreichend spezifisch. In Zukunft könnte daher durch ein systematisches Ausschlussverfahren der Wobble-Positionen die Spezifität der Primer erhöht und HIF-1 α in *A. islandica* über RT-PCR nachgewiesen werden. Andererseits wurden die von Evertbraten vorliegenden HIF-1 α -Sequenzen nicht über RT-PCR bestimmt: Die *Caenorhabditis elegans*-Sequenz wurde im Rahmen eines Sequenzierprojektes identifiziert; die *Daphnia magna*-Sequenz wurde anhand der Zwei-Hybrid-Methode gefunden (Yamagato, unveröffentl.). Diese Methode beruht auf Protein-Protein-Wechselwirkungen. Im konkreten Beispiel wurde das HIF-1 α Protein über Wechselwirkung mit HIF-1 β identifiziert. Da HIF-1 α auf Proteinebene wesentlich stärker konserviert ist als auf DNA-Ebene (Heise, 2005), dürfte die Isolierung auf Proteinebene unproblematischer sein.

4.3. Abschlussbetrachtung und Ausblick

Auch nach einwöchiger Hypoxie-Inkubation bei 1-2% O₂ von *A. islandica* war kein Absinken des intrazellulären pH-Werts zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass die niedrige O₂-Konzentration für diese Tiere noch ausreichte, um bei reduziertem Energieumsatz im Wesentlichen ohne anaerobe Energiegewinnung auszukommen. Auf einen reduzierten Energiehaushalt unter Hypoxie deutet auch die Abnahme im Glutathion-Gesamtgehalt der Mitteldarmdrüse hin.

Die vermutete Steigerung der antioxidativen Kapazität war über den Glutathiongehalt nicht festzustellen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass andere Antioxidantien oder antioxidative Enzyme nach einer Woche Hypoxie in erhöhten Konzentrationen vorlagen. Dies wird zurzeit in einer anderen Untersuchung getestet.

Für die Isolierung der HIF-1 α - Sequenz aus *A. islandica* kann über ein systematisches Ausschlussverfahren versucht werden, die Wobble-Positionen in den Primern zu reduzieren und so die Primerspezifität zu erhöhen. Es könnte aber auch über eine auf Proteinebene arbeitende Methode, wie die Zwei-Hybrid-Methode (s.o.), versucht werden, das Gen zu finden.

5. Literatur

- Abele D. 2002. The radical life-giver. *Nature* 420, 27
- Abele D., Puntarulo S. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 138, 405-415
- Abele-Oeschger D., Oeschger R. 1995. Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 187, 63-80
- Acker T., Acker H. 2004. Review. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *The Journal of Experimental Biology* 207, 3171-3188
- Ahn I.Y., Kim K.W., Choi H.J. 2002. A baseline study on metal concentrations in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Gastropoda: Patellidae) on King George Island: variations with sex and body parts. *Mar Pollut Bull* 44, 5, 424-431
- Alyakrinskaya I.O. 2003. Tissue Hemoglobins in Bivalvia (Mollusca). *Biology Bulletin*. 30, 6, 617-626
- Asensi M., Sastre J., Pallardo F.V., Lloret A., Lehner M., Garcia-de-la Asuncion J., Vina J. 1999. Ratio of reduced to oxidized Glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Methods of Enzymol.* 299, 267-276
- Boutilier R.G., St-Pierre J. 2000. Surviving hypoxia without really dying. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 126, 481-490
- Bracken C.P., Whitelaw M.L., Peet D.J. 2003. The hypoxia-inducible factor: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1376-1393
- Brand A.R., Taylor A.C. 1974. Pumping activity of *Arctica islandica* (L.) and some other common bivalves. *Mar. Behav. Physiol.* 3, 1-15
- Bunn H.F., Poyton R.O. 1996. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Reviews* 76, 3, 839-885
- Butler R.A., Roesijardi G. 2001. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of a molluscan metallothionein mRNA. *Aquatic Toxicology* 54, 59-67
- Canesi L., Ciacci C., Betti M., Gallo G. 1999. Growth factor-mediated signal transduction and redox balance in isolated digestive gland cells from *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 125, 355-363
- Canesi L., Viarengo A. 1997. Age-related differences in Glutathione metabolism in mussel tissues (*Mytilus edulis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 116B, 2, 217-221

- Chandel N.S., Budinger G.R., Choe S.H., Schumacker P.T. 1997. Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *Journal of Biol. Chem.* 270, 402-415
- Chandel N.S., Maltepe E., Goldwasser E., Mathieu C.E., Somin M.C., Schumacker P.T. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 11715-11720
- Chandel N.S., McClintock D.S., Feliciano C.E., Wood T.M., Melendez J.A., Rodriguez A.M., Schumacker P.T. 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor- α during hypoxia. *Journal of Biol. Chem.* 275, 25130-25138
- Chandel N.S., Schumacker P.T. 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J. Appl. Physiol.* 88, 1880-1889
- Choi H.J., Ahn I.Y., Kim K.W., Kim H.A., Lee I.S. 2003. Subcellular distribution of naturally elevated cadmium in the anartctic clam *Laternula elliptica*. *Bull. Environ Contam Toxicol.* 71, 1, 83-89
- Diaz R.J., Rosenberg R. 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 33, 245-303
- Estevez S.M., Abele D., Puntarulo S. 2002. Lipid radical generation in polar (*Laternula elliptica*) and temperate (*Mya arenaria*) bivalves. *Comp. Biochem. Phys B* 132, 729-737
- Fandrey J., Frede S., Jelkmann W. 1994. Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem. J.* 303, 507-510
- Farris M.W., Reed D.J. 1987. High-performance liquid chromatography of thiols and disulfids: diphenol derivatives. *Meth. Enzymol.* 143, 101-109
- Fleming J.E., Leon H.A., Miquel J. 1981. Effects of ethidium bromide on development and aging of *Drosophila*: implications for the free radical living theory of aging. *Exp. Gerontol* 16, 287-293
- Gerlach S.A. 1986. Langfristige Trends bei den Nährstoff-Konzentrationen im Winterwasser und Daten für eine Bilanzierung der Nährstoffe in der Kieler Bucht. *Meeresforschung* 31, 153-174
- Gerlach S.A. 1994. Sauerstoffmangel im Tiefenwasser der Ostsee. *Spezielle Ökologie Marine Systeme*. Springer Verlag
- Gorr T.A., Cahn J.D., Yamagata H., Bunn F.H. 2004. Hypoxia-induced Synthesis of Hemoglobin in the Crustacean *Daphnia magna* is Hypoxia-inducible Factor-dependent. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 34, 36038-36047
- Grieshaber M.K., Hardewig I., Kreutzner U., Pörtner H.O. 1994. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Physiol. Biochem. Pharmacol.* 125, 43-147

- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publications. 3rd Edition, 146-150
- Heise K. 2005. Interaction of oxygen supply, oxidative stress, and molecular defence systems during temperature stress in fishes. Doktorarbeit an der Universität Bremen
- Hermes-Lima M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. Aus: Storey K.B. (ed.), Functional metabolism: Regulation and adaptation 319-368
- Hermes-Lima M., Zenteno-Savín T. 2002. animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 133, 537-556
- Hochachka P.W., Lutz P.L. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 130, 435-459
- Holmes S.P., Witbaard R., Van der Meer J. 2003. Phenotypic and genotypic population differentiation in the bivalve mollusc *Arctica islandica*: results from RAPD analysis. Marine Ecology Progress Series 254, 163-176
- Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7987-7992
- Hylleberg J., Riis-Vestergaard H. 1984. Marine environments; the fate of detritus. Akademisk Forlag
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin W.G. Jr. 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. Science 292, 464-468
- Iyer N.V., Leung S.W., Semenza G.L. 1998. The human hypoxia-inducible factor 1 α Gene: *HIF1A* structure and evolutionary conservation. Genomics 52, 159-165
- Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.J., Gielberg J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherij M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliff P.J. 2001. Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. Science 292, 468-472
- Jeong J-W, Bae M-K, Ahn M-Y, Kim S-H, Sohn T-K, Bae M-H, Yoo M-A, Song E.J., Lee K-J, Kim K-W 2002. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. Cell 111, 709-720
- Jiang B-H, Semenza G.L., Bauer C., Marti H.H. 1996. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. The American Physiological Society , C1172-C1180
- Jiang B-H, Zheng J.Z., Leung S.W., Roe R., Semenza G.L. 1997. transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . The Journal of Biological Chemistry 272, 31, 19253-19260
- Kaelin W.G.Jr 2005. Proline hydroxylation and gene expression. Annu. Rev. Biochem. 74, 115-128

- Kidd, P.M., 1997. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt. Med. Rev.* 1, 155-176
- Kietzmann T., Fandrey J., Acker H. 2000. Oxygenradicals as messengers in oxygen-dependent gene expression. *New Physiol Sci.* 15, 202-208
- Lando D., Peet D.J., Gorman J.J., Whelan D.A., Whitelaw M.L., Bruick R.K. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development* 16, 1466-1471
- Larade K., Storey K.B. 2002. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. *Cell and Molecular Responses to Stress. Aus: Sensing, Signalling and Cell Adaptation* edited by Storey K.B. and Storey J.M. Elsevier Press, Amsterdam
- Livingston D.R., Garcia Martinez P., Michel X., Narbonne J.F., O'Hara S.C.M., Ribera S.D., Winston G.W. 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Funct. Ecol.* 4, 415-424
- Livingston D.R., Lips F., Garcia Martinez P., Pipe R.K. 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 112, 265-276
- Moyes D.C., Hood D.A. 2003. Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrates muscle. *Annual Review of Physiology* 65, 177-201
- 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* 133, 1-16
- Oeschger R. 1990. long-term anaerobioses in sublittoral marine invertebrates from the Western Baltic Sea: *Halicryptus spinulosus* (Priapulida), *Astarte borealis* and *Arctica islandica* (Bivalvia). *Marine Ecology Progress Series* 59, 133-143
- Pannunzio T.M., Storey K.B. 1997. Antioxidant defences and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorin littorea*. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology* 221, 277-292
- Pearl R. 1928. *The rate of living*. New York: Alfred Knopf
- Pena-Llopis S., Ferrando M.D., Pena J.B. 2001. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere* 47, 485-497
- Philipp E., Brey T., Pörtner H.O., Abele D. 2005. Chronological and physiological ageing in a polar and a temperate mud clam. *Mechanism of Ageing and Development* 126, 598-609
- Pörtner H.O., Boutilier R.G., Tang Y., Toews D.P. 1990. Determination of intracellular pH and PCO₂ after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respiration Physiology* 81, 255-274
- Reed D.J. 1990. Glutathione: Toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 603-631

- Rhodes L.D., Van Beneden R.J. 1997. Isolation of the cDNA and characterization of mRNA expression of ribosomal protein S19 from the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Gene* 197, 295-304
- Schafer F.Q., Buettner G.R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine* 30, 11, 1191-1212
- Schmid T., Zhou J., Brüne B. 2004. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* 8, 4, 423-431
- Schöne B.R., Oschmann W., Rössler J., Freyre Castro A.D., Houk S.D., Kröncke I., Dreyer W., Janssen R., Rumohr H., Dunca E. 2003. North Atlantic Oscillation dynamics recorded in shells of a long-lived bivalve mollusc. *Geology* 31, 12, 1037-1040
- Schöne B.R., Houk S.D., Freyre Castro D.A., Fiebig J., Oschmann W. 2005. Daily growth rates in shells of *Arctica islandica*: Assessing sub-seasonal environmental controls on a long-lived Bivalve Mollusk. *Palaios* 20, 78-92
- Schroedl C., McClintock D.S., Budinger S.G.R., Chandel N.S. 2002. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 α requires mitochondrial reactive oxygen species
- Semanza G.L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Op. Gen. Develop.* 8, 588-594
- Semanza G.L. 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64, 993-998
- Semanza G.L. 2004. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiol.* 19, 176-182
- Semanza G.L., Roth P.H., Fang H-M, Wang G.L. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by Hypoxia-inducible Factor 1. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 38, 23757-23763
- Sies H. 1985. Oxidative Stress: Introductory remarks. Aus: *Oxidative Stress*, edited by Sies H. London, New York: Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 1-8
- Soitamo A.J., Rabergh C.M.I., Grassmann M., Sistonen L., Nikinmaa M. 2001. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. *J. Biol. Chem.* 276, 19677-19705
- Storey K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 1715-1733
- Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R.H., Neil D.A.H., Grassmann M., Candinas D. 2001. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 15, 244-2453
- Taylor A.C. 1976. Burrowing behaviour and anaerobiosis in the bivalve *Arctica islandica* (L.). *J. mar. biol. Ass. U.K.* 56, 95-109

- Taylor A.C., Brand A.R. 1975. Effects of hypoxia and body size on the oxygen consumption of the bivalve *Arctica islandica* (L.). J. exp. Mar. Biol. Ecol. 19, 187-196
- Theede H. 1973. Comparative studies on the influence of oxygen deficiency and hydrogen sulphide on marine bottom invertebrates. Netherlands Journal of Sea Research 7, 244-252
- Treinin M., Shilar J., Jiang H., Powell-Coffmann J.A., Bromberg Z., Horowitz M. 2003. HIF-1 is required for heat acclimation in the nematode *Caenorabditis elegans*. Physiol. Genom 14, 17-24
- Tschischka K., Abele D., Pörtner H.O. 2000. Mitochondrial oxyconformity and cold adaptation in the polychaete *Nereis pelagica* and the bivalve *Arctica islandica* from the baltic and white seas. The Journal of Experimental Biology 203, 3355-3368
- Viarengo A., Canesi L., Garcia Martinez P., Peters L.D. , Livingston D.R. 1995. Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). Comp. Biochem. Physiol. 111B, 1, 119-126
- Wehner R., Gehring W. 1995. Zoologie. 23.Auflage. Thieme Verlag
- Witbaard R., Jenness M.I., Van der Borg K., Ganssen G. 1994. Verification of annual growth increments in *Arctica islandica* L. from the north sea by means of oxygen and carbon isotopes. Netherlands Journal of Sea Research 33 (1), 91-101
- Zettler M.L., Boensch R., Gosselck F. 2001. Distribution, abundance and some population characteristics of the ocean quahog, *Arctica islandica* (Linnaeus, 1767), in the Mecklenburg Bight (Baltic Sea). Journal of Shellfish Reaserch 20, 1, 161-169

6. Anhang

Tab. 6-1: Einzelwerte der Glutathionergebnisse mit Mittelwerte und Standardabweichungen

Probe	GSH/FG	Mittelwert	Standard	GSSG/FG	Mittelwert	Standard	totalGlutathion	Mittelwert	Standard	Verhältnis	Mittelwert	Standard
K0	42,043			44,488			131,019			1,058		
K0	194,277			50,295			294,867			0,259		
K0	310,231			71,478			453,187			0,230		
K0	201,608			24,916			251,440			0,124		
K0	75,487			13,541			102,568			0,179		
K0	161,095			21,568			204,231			0,134		
K0	116,401	157,306	89,799	16,699	34,712	21,337	149,799	226,730	120,787	0,143	0,304	0,336
K6	88,917			23,939			136,795			0,269		
K6	214,704			28,562			271,827			0,133		
K6	154,302			26,942			208,186			0,175		
K6	300,369			32,287			364,944			0,107		
K6	79,951	167,649	92,055	23,053	26,957	3,719	126,058	221,562	99,462	0,288	0,195	0,081
K12				24,622								
K12	135,914			9,914			155,741			0,073		
K12	111,196			14,773			140,742			0,133		
K12		123,555	17,478	45,924	12,343	3,436		148,241	10,606		0,103	0,042
K24	51,478			15,540			82,558			0,302		
K24	191,076			34,068			259,212			0,178		
K24	111,137	117,897	70,044	16,501	22,036	10,431	144,138	161,969	89,666	0,148	0,210	0,081
K48	139,544			38,461			216,466			0,276		
K48	161,650			20,955			203,559			0,130		
K48	151,163			32,776			216,716			0,217		
K48				11,694								
K48	186,881	159,810	20,180	23,606	28,950	8,115	234,093	217,709	12,532	0,126	0,187	0,072
K168	133,190			10,933			155,057			0,082		
K168	26,592			4,924			36,441			0,185		
K168	107,046			19,008			145,063			0,178		
K168	213,538	120,091	77,063	15,467	12,583	6,082	244,471	145,258	85,207	0,072	0,129	0,060

Probe	GSH/FG	Mittelwert	Standard	GSSG/FG	Mittelwert	Standard	totalGlutathion	Mittelwert	Standard	Verhältnis	Mittelwert	Standard
M0	216,389			18,688			253,765			0,086		
M0	238,067			37,229			312,524			0,156		
M0	163,665			33,710			231,086			0,206		
M0	154,358			14,890			184,138			0,096		
M0	194,798			5,317			205,432			0,027		
M0	172,354			8,864			190,082			0,051		
M0	350,338	212,853	67,525	10,232	18,419	12,451	370,803	249,690	69,268	0,029	0,093	0,067
M6	103,924			19,516			142,956			0,188		
M6	255,211			15,185			285,582			0,060		
M6	223,755			3,960			231,675			0,018		
M6	352,177			17,167			386,511			0,049		
M6	95,282			16,699			128,680			0,175		
M6	294,687	220,839	103,273	28,978	16,918	8,040	352,642	254,674	106,601	0,098	0,098	0,070
M12	156,752			11,611			179,974			0,074		
M12	417,903			6,376			430,256			0,015		
M12	104,134			26,763			157,661			0,257		
M12	222,096			41,202			304,499			0,186		
M12	236,419	227,461	118,940	21,667	16,605	9,281	279,754	270,429	109,191	0,092	0,125	0,096
M24	79,432			14,530			108,492			0,183		
M24	301,072			31,433			363,938			0,104		
M24	119,741			21,382			162,505			0,179		
M24	236,371	184,154	102,489	25,607	23,238	7,119	287,585	230,630	116,295	0,108	0,144	0,043
M48	180,708			7,900			196,507			0,044		
M48	196,575			21,952			240,479			0,112		
M48	77,447			1,961			81,369			0,025		
M48	167,728			10,727			153,751			0,064		
M48	199,931	164,478	50,337	14,281	11,364	7,441	228,492	180,120	64,612	0,071	0,063	0,033
M168	198,008			15,530			229,068			0,078		
M168	274,678			24,136			322,950			0,088		
M168	243,774			12,376			268,526			0,051		
M168	348,008	266,117	63,028	22,265	18,577	5,545	392,537	303,270	70,873	0,064	0,070	0,016

Probe	GSH/FG	Mittelwert	Standard	GSSG/FG	Mittelwert	Standard	totalGlutathion	Mittelwert	Standard	Verhältnis	Mittelwert	Standard
D0	197,826			117,916			433,659			0,596		
D0	162,078			271,112			704,302			1,673		
D0	279,214			152,833			584,879			0,547		
D0	290,352			275,462			841,276			0,949		
D0	348,772			131,279			611,331			0,376		
D0	274,851			95,767			466,384			0,348		
D0	335,730			261,813			859,356			0,780		
D0	411,582	287,551	80,610	131,851	179,754	76,052	675,284	647,059	155,926	0,320	0,699	0,451
D6	264,378			200,123			664,623			0,757		
D6	152,054			112,814			377,683			0,742		
D6	288,139	234,857	72,687	119,191	144,043	48,671	526,521	522,942	143,504	0,414	0,638	0,194
D12				94,673								
D12	317,204			168,399			654,003			0,531		
D12	234,505			164,206			562,917			0,700		
D12	179,331			90,382			309,960			0,504		
D12	199,344	232,596	60,841	97,427	130,104	41,933	394,198	480,269	156,447	0,489	0,556	0,098
D24	60,935			89,724			240,383			1,472		
D24	291,305			87,885			467,075			0,302		
D24	251,044			195,592			642,228			0,779		
D24	318,806			145,479			609,765			0,456		
D24	188,102	222,038	102,602	212,983	146,333	58,074	614,068	514,704	167,849	1,132	0,828	0,481
D48	171,121			184,871			540,863			1,080		
D48	199,931			242,281			684,492			1,212		
D48	213,014			183,429			579,872			0,861		
D48	107,883			211,879			531,641			1,964		
D48	121,459	162,682	46,621	256,743	215,841	33,156	634,945	594,363	64,762	2,114	1,446	0,558
D168	192,310			188,777			569,865			0,982		
D168	83,164			156,055			395,274			1,876		
D168	132,976	136,150	54,642	49,502	131,445	72,826	231,980	399,040	168,974	0,372	1,077	0,757

Tab. 6-2: Redoxpotential-Einzelwerte mit Mittelwert und Standardabweichung

Inkubationszeit [h]	Gewebe	E bei in situ temp und in situ pHi	Mittelwert	Standard
0	MDD	-285,415		
0	MDD	-270,392		
0	MDD	-290,659		
0	MDD	-284,425		
0	MDD	-297,942		
0	MDD	-295,978		
0	MDD	-288,589		
0	MDD	-301,930	-289,416	9,837
6	MDD	-286,037		
6	MDD	-279,533		
6	MDD	-294,460	-286,677	7,484
12	MDD	-285,525		
12	MDD	-287,930	-286,727	1,701
24	MDD	-260,012		
24	MDD	-298,445		
24	MDD	-285,054		
24	MDD	-294,497		
24	MDD	-276,971	-282,996	15,327
48	MDD	-276,389		
48	MDD	-276,886		
48	MDD	-281,828		
48	MDD	-263,467		
48	MDD	-264,016	-272,517	8,291
168	MDD	-278,983		
168	MDD	-260,848		
168	MDD	-286,312	-275,381	13,108
0	K	-304,234		
0	K	-311,367		
0	K	-313,708		
0	K	-297,176		
0	K	-309,995		
0	K	-305,187	-306,945	6,008
6	K	-294,220		
6	K	-313,578		
6	K	-306,229		
6	K	-320,276		
6	K	-292,086	-305,278	12,156
12	K	-315,331		
12	K	-305,566	-310,448	6,905
24	K	-286,154		
24	K	-308,582		
24	K	-304,203	-299,646	11,888
48	K	-299,433		
48	K	-310,431		
48	K	-303,336		
48	K	-312,517	-306,429	6,099
168	K	-313,642		

Inkubationszeit [h]	Gewebe	E bei in situ temp und in situ pHi	Mittelwert	Standard
168	K	-284,057		
168	K	-301,562		
168	K	-320,930	-305,048	16,113
0	M	-322,491		
0	M	-316,411		
0	M	-308,478		
0	M	-317,019		
0	M	-335,262		
0	M	-326,039		
0	M	-341,598	-323,900	11,476
6	M	-304,064		
6	M	-329,050		
6	M	-342,239		
6	M	-335,412		
6	M	-303,848		
6	M	-324,675	-323,215	16,054
12	M	-320,430		
12	M	-351,672		
12	M	-300,260		
12	M	-313,479		
12	M	-322,846	-321,737	12,401
24	M	-301,105		
24	M	-324,206		
24	M	-306,407		
24	M	-338,800		
24	M	-320,803	-313,130	11,126
48	M	-328,599		
48	M	-318,183		
48	M	-324,926		
48	M	-323,048		
48	M	-323,842	-323,720	3,755
168	M	-322,583		
168	M	-325,190		
168	M	-330,427		
168	M	-331,949	-327,537	4,392

Tab. 6-3: Identität (ID) und Ähnlichkeit (Sim) des untersuchten Bivalvia- und *Gadus morhua* Actin-Abschnittes auf Nukleotid (DNA)- und Proteinebene (Pep)

	ID:DNA	ID:Pep	Sim:Pep
<i>Dreissena polymorpha</i>			
<i>Arctica islandica</i>	84%	97%	99%
<i>Dreissena polymorpha</i>			
<i>Pecten maximus</i>	82%	90%	94%
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	84%	95%	97%
<i>Crassostera virginica</i>	82%	94%	97%
<i>Crassostera gigas</i>	82%	95%	98%
<i>Gadus morhua</i>	81%	93%	98%

	ID:DNA	ID:Pep	Sim:Pep
<i>Pecten maximus</i>			
<i>Arctica islandica</i>	87%	92%	94%
<i>Dreissena polymorpha</i>	82%	90%	94%
<i>Pecten maximus</i>			
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	96%	94%	96%
<i>Crassostera virginica</i>	81%	87%	93%
<i>Crassostera gigas</i>	81%	88%	94%
<i>Gadus morhua</i>	78%	87%	94%

	ID:DNA	ID:Pep	Sim:Pep
<i>M. galloprovincialis</i>			
<i>Arctica islandica</i>	88%	95%	98%
<i>Dreissena polymorpha</i>	84%	95%	97%
<i>Pecten maximus</i>	96%	94%	96%
<i>Mytilus galloprovincialis</i>			
<i>Crassostera virginica</i>	83%	92%	98%
<i>Crassostera gigas</i>	82%	93%	97%
<i>Gadus morhua</i>	79%	93%	97%

	ID:DNA	ID:Pep	Sim:Pep
<i>Crassostera virginica</i>			
<i>Arctica islandica</i>	84%	94%	97%
<i>Dreissena polymorpha</i>	82%	94%	97%
<i>Pecten maximus</i>	81%	87%	93%
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	83%	92%	98%
<i>Crassostera virginica</i>			
<i>Crassostera gigas</i>	91%	97%	98%
<i>Gadus morhua</i>	82%	91%	96%

	ID:DNA	ID:Pep	Sim:Pep
<i>Crassostera gigas</i>			
<i>Arctica islandica</i>	83%	95%	98%
<i>Dreissena polymorpha</i>	82%	95%	98%
<i>Pecten maximus</i>	82%	88%	94%
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	82%	93%	97%
<i>Crassostera virginica</i>	91%	97%	98%
<i>Crassostera gigas</i>			
<i>Gadus morhua</i>	82%	92%	97%

	ID:DNA	ID:Pep	Sim:Pep
<i>Gadus morhua</i>			
<i>Arctica islandica</i>	83%	95%	98%
<i>Dreissena polymorpha</i>	81%	93%	98%
<i>Pecten maximus</i>	78%	87%	94%
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	79%	93%	97%
<i>Crassostera virginica</i>	82%	91%	96%
<i>Crassostera gigas</i>	82%	92%	97%
<i>Gadus morhua</i>			

Danksagung

Ein besonderes Dankeschön an...

...**Privatdozentin Dr. Doris Abele** für die Vergabe des Themas und die gute Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit sowie die Begutachtung meiner Diplomarbeit

...**Prof. Dr. Gunter Otto Kirst** für die Begutachtung meiner Diplomarbeit

...**Dr. Magnus Lucassen** für die gute Betreuung und Unterstützung der molekularbiologischen Arbeiten

...**Dr. Katja Heise** für die geduldige Betreuung und Unterstützung in jeder Angelegenheit und die dabei entstandene Freundschaft

...**Timo Hirse, Stefanie Meyer, Nils Koschnick** und **Boris Klein** dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen

...die **Mitglieder der Arbeitsgruppe von PD Dr. Doris Abele** für die freundliche Aufnahme, tolle Zusammenarbeit und Unterstützung

...die **Besatzung des S1-Labors** für die prima Zusammenarbeit und Hilfe bei meinen Missgeschicken

...die **Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Otto Pörtner** für die gute Zusammenarbeit und freundliche Atmosphäre

...**Dr. Alexander Lüdeking** für die guten Tips und Tricks

...**Maike, Julia, Katrin, Florian, Eva** und **Rebecca** für das Korrekturlesen

...**meine Eltern** und **meinen Bruder**, die mir mein Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben

...**Christian**, ohne den ich das alles nicht geschafft hätte

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bremen, September 2005

(Ellen Weihe)