

Untersuchungen zur Expression der murinen Carnosin-Synthase und Etablierung einer Methode zur nicht-radioaktiven Enzymaktivitätsbestimmung

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jana Asisa Saile

aus

Mainz

Bonn, 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Gieselmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der Promotion: 26.08.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Carnosin und verwandte Dipeptide	3
2.2 Physiologische Funktion von Carnosin in Säugetieren.....	4
2.2.1 Carnosin im Skelettmuskel.....	5
2.2.2 Carnosin und Diabetes mellitus	6
2.2.3 Carnosin als endogenes Antioxidans	6
2.2.4 Carnosin und Herz-Kreislauf-System.....	7
2.2.5 Carnosin und Alzheimer-Krankheit	8
2.2.6 Carnosin im zentralen Nervensystem	8
2.3 Synthese und Abbau von Carnosin.....	9
2.4 Carnosin-Synthase.....	11
2.5 Aufgabenstellung	13
3 Material.....	14
3.1 Geräte	14
3.2 Chemikalien	15
3.3 Verbrauchsmaterialien	15
3.4 Puffer, Lösungen und Medien	16
3.5 Lösungen und Medien für die Bakterienkultivierung.....	20
3.6 Medien für die Zellkultur	20
3.7 Enzyme und Reagenzien	21

3.8	Kits	21
3.9	Größenstandards für Gelelektrophoresen	22
3.10	Antikörper	22
3.11	Plasmide und Vektoren	23
3.12	Oligonukleotide.....	24
3.13	Bakterienstämme.....	25
3.14	Zelllinien	25
3.15	Mauslinien	25
3.16	Software und Datenbanken.....	26
4	Methoden.....	27
4.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	27
4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
4.1.2	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	28
4.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	29
4.1.4	Phenol/Chloroform-Fällung	30
4.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
4.1.6	Transformation von <i>E.coli</i> XL1 blue	31
4.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA	31
4.1.8	Transformation von <i>E.coli</i> DH10 Bac	32
4.1.9	Isolierung von Bacmid-DNA	32
4.1.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
4.1.11	Sequenzierung.....	33
4.1.12	RNA-Extraktion (Chomczynski und Sacchi, 1987).....	33
4.1.13	cDNA-Synthese	34

4.1.14	Quantitative <i>real-time</i> PCR	34
4.1.15	Herstellung der Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonden	35
4.1.16	RNA-Gelelektrophorese	37
4.1.17	RNA-Transfer mittels Northern Blot	37
4.2	Arbeiten mit Proteinen und Peptiden	38
4.2.1	Proteinbestimmung	38
4.2.2	SDS-PAGE	38
4.2.3	Protein-Transfer mittels Western Blot (<i>semi-dry</i>)	39
4.2.4	Coomassiefärbung von SDS-Gelen und PVDF-Membranen	40
4.2.5	Herstellung von Gewebehomogenaten	40
4.2.6	Herstellung von Peptidextrakten	41
4.2.7	Dünnschichtchromatographie	41
4.3	Herstellung und Färbung von Gewebeschnitten	42
4.3.1	Perfusion von Mäusen	42
4.3.2	Dekalzifizierung	42
4.3.3	Gefrierschnitte	43
4.3.4	Paraffinschnitte	43
4.3.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	43
4.3.6	Immunfluoreszenzfärbung	44
4.3.7	<i>In situ</i> Hybridisierung	44
4.4	Arbeiten mit Zellen	46
4.4.1	Kultivieren von Zellen	46
4.4.2	Passagieren von Zellen	46

4.4.3	Auftauen von Zellen	46
4.4.4	Einfrieren von Zellen	47
4.4.5	Transfektion von Sf-9-Zellen	47
4.4.6	Titerbestimmung des Baculoviren-Stocks	47
4.4.7	Infektion von Sf-9-Zellen	48
4.4.8	Infektion von <i>High Five</i> -Zellen.....	48
4.5	Carnosin-Synthase Produktion und Reinigung.....	48
4.5.1	Produktion von HST-Carns1 mithilfe des Baculovirus-Systems	48
4.5.2	Herstellung des <i>High Five</i> -Zelllysates	49
4.5.3	Affinitätsreinigung der HST-Carns1.....	49
4.5.4	TEV-Proteaseverdau.....	50
4.5.5	Größenausschlusschromatographie	50
4.5.6	Nicht-radioaktive Enzymaktivitätsbestimmung	51
5	Ergebnisse	53
5.1	Expression der Carnosin-Synthase im Mausgewebe	53
5.1.1	Western Blot-Analysen.....	53
5.1.2	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	55
5.1.3	Dünnschichtchromatographie.....	64
5.1.4	<i>In situ</i> Hybridisierung und Northern Blot-Analysen.....	66
5.1.5	Quantitative <i>real-time</i> PCR Analysen.....	68
5.1.6	Altersabhängige Zunahme der Konzentration von Carnosin- Synthase und Carnosin im Gewebe.....	75
5.2	Heterologe Expression und Aktivitätsbestimmung	79

5.2.1	Expression der murinen Carnosin-Synthase in Insektenzellen	79
5.2.2	Prinzip der nicht-radioaktiven Enzymaktivitätsbestimmung.....	82
5.2.3	Aktivitätsbestimmung	83
5.2.4	Linearitätsnachweis und spezifische Enzymaktivität.....	85
5.2.5	K_m -Wertbestimmung	88
5.2.6	Substratspezifität	89
6	Diskussion	91
6.1	Expression der Carnosin-Synthase im Mausgewebe	91
6.1.1	Detektion von Carnosin-Synthase und Carnosin	91
6.1.2	Nachweis der Carnosin-Synthase-mRNA mit ihren verschiedenen Transkriptvarianten	95
6.1.3	Modell zur Regulation der Carnosin-Konzentration.....	101
6.1.4	Transport der Carnosin-Synthase ins Riechhirn	102
6.1.5	Altersabhängige Zunahme der Konzentration von Carnosin- Synthase und Carnosin im Gewebe.....	103
6.2	Heterologe Expression und Aktivitätsbestimmung	106
6.2.1	Heterologe Expression der murinen Carnosin-Synthase	107
6.2.2	Etablierung einer nicht-radioaktiven Methode zur Aktivitäts- bestimmung der Carnosin-Synthase.....	108
6.2.3	K_m -Wert-Bestimmung.....	109
6.2.4	Substratspezifität der murinen Carnosin-Synthase	111

6.3	Erklärungsansatz zur physiologischen Funktion von Carnosin bzw. β -Alanin und Anwendungsgebiet für die Enzymaktivitäts- bestimmung.....	113
7	Literaturverzeichnis.....	116
8	Anhang	126
	Erklärung.....	127
	Danksagung	128
	Lebenslauf.....	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Struktur von Carnosin und verwandten Dipeptiden.	4
Abbildung 2.2 Synthese von Carnosin aus β -Alanin und L-Histidin.....	10
Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der mRNA-Struktur der murinen Carnosin-Synthase.....	12
Abbildung 5.1: Western Blot-Analysen von Wildtyp- und <i>Carns1-knock-out</i> -Gewebehomogenaten.	55
Abbildung 5.2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines koronalen Nasenschnittes.....	56
Abbildung 5.3: Konfokale Laserscanmikroskopie des Riechepithels.....	59
Abbildung 5.4: Immunfluoreszenzmikroskopie des Riechepithels und Riechhirns.	62
Abbildung 5.5 Immunfluoreszenzmikroskopie des Vomeronasalorgans.	63
Abbildung 5.6: Dünnschichtchromatographie von Peptidextrakten.	65
Abbildung 5.7: <i>In situ</i> Hybridisierung.	66
Abbildung 5.8: Northern Blot-Analyse.	68
Abbildung 5.9: Quantitative <i>real-time</i> PCR-Analyse der Carnosin-Synthase.	70
Abbildung 5.10: Schematischer RNA-Sequenz-Vergleich.....	71
Abbildung 5.11: Quantitative <i>real-time</i> PCR-Analyse der einzelnen Transkriptvarianten und lncRNA.....	75
Abbildung 5.12: Altersabhängige Carnosin-Synthase-Konzentration im Riechhirn.....	76
Abbildung 5.13: Altersabhängige Carnosin-Konzentration im Riechhirn und Skelettmuskel.....	78

Abbildung 5.14: Fraktionen einer repräsentativen HST-Carns1-Affinitätsaufreinigung im SDS-Gel.	80
Abbildung 5.15: Kontrolle der Reinigung der rekombinanten murinen Carnosin-Synthase.....	82
Abbildung 5.16: Schematische Darstellung der gekoppelten Enzymreaktion zur Aktivitätsbestimmung.....	83
Abbildung 5.17: Aktivitätsbestimmung der Carnosin-Synthase.	84
Abbildung 5.18: Linearitätsnachweis der gekoppelten Enzymaktivitätsbestimmung.	86
Abbildung 5.19: Berechnung der spezifischen Enzymaktivität.....	87
Abbildung 5.20: K_m -Wert-Bestimmung der murinen Carnosin-Synthase.	89
Abbildung 5.21: Substratspezifität der murinen Carnosin-Synthase.....	90

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptionseinheit (engl.: <i>absorbance unit</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
Carns1	Carnosin-Synthase
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,3'-(5'-chloro)tricyclodecan]-4-yl)phenylphosphat (engl.: <i>chloro-5-substituted adamantly-1,2-dioxetane phosphate</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz (engl.: <i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Verstärkt grün fluoreszierendes Protein (engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
FPLC	schnelle Protein-Flüssigchromatographie (engl.: <i>fast protein liquid chromatography</i>)
GABA	γ -Aminobuttersäure (engl.: <i>γ-aminobutyric acid</i>)
gp	Meerschweinchen (engl.: <i>guinea pig</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hnRNA	heterogene Kern-RNA (engl.: <i>heterogeneous nuclear RNA</i>)

Abkürzungsverzeichnis

HPTLC	Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (engl.: <i>high performance thin layer chromatography</i>)
hz	Heterozygot
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K_m	Michaelis Menten-Konstante
ko	engl.: <i>knock-out</i>
LB	Luria-Bertani
lncRNA	lange nicht-kodierende RNA (engl.: <i>long non-coding RNA</i>)
MESG	2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin-Ribonukleosid
MOI	Infektionsvielfachheit (engl.: <i>multiplicity of infection</i>)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
NBT / BCIP	Nitroblautetrazoliumchlorid /5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
NGS	Ziegenerum (engl.: <i>normal goat serum</i>)
OMP	Olfaktorisches Markerprotein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
P_i	anorganisches Phosphat (engl.: <i>inorganic phosphate</i>)
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
PNP	Purinnukleosidphosphorylase
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit PCR (engl.: <i>quantitative real-time PCR</i>)
rb	Kaninchen (engl.: <i>rabbit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RPS2	Ribosomales Protein S 2
rRNA	ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation</i>)
SE	Standardfehler (engl.: <i>standard error</i>)
siRNA	kleine eingreifende RNA (engl.: <i>small interfering RNA</i>)
SSC	Natriumcitrat-Puffer (engl.: <i>saline sodium citrate</i>)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>tris-buffered saline</i>)
TCA	Trichloressigsäure (engl.: <i>trichloroacetic acid</i>)
TEV	Tabak Etch Virus (engl.: <i>tobacco etch virus</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
V1R	Vomeronasalrezeptor 1
V2R	Vomeronasalrezeptor 2
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1 Zusammenfassung

Das Dipeptid Carnosin (β -Alanyl-L-histidin) war das erste Peptid, das aus tierischem Gewebe isoliert wurde. Es kommt vor allem in Säugetieren in hohen Konzentrationen im Skelettmuskel und der Riechbahn vor. Bis heute ist seine physiologische Funktion unklar, wobei schon viele verschiedene Aufgaben postuliert wurden. Im Gegensatz zu den meisten anderen tierischen Peptiden wird Carnosin nicht ribosomal synthetisiert, sondern wird durch die Carnosin-Synthase in einem ATP-abhängigen Prozess aus β -Alanin und L-Histidin gebildet und kann durch die Carnosinase gespalten werden.

Die murine Carnosin-Synthase sollte in der vorliegenden Arbeit weiter charakterisiert werden. Dazu wurde die Expression des Enzyms im Gewebe erstmals sowohl auf Transkriptebene als auch auf Proteinebene untersucht. Es zeigte sich, dass die Carnosin-Synthase-mRNA, sowie zwei weitere vorhergesagte Transkriptvarianten und eine lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) gewebespezifisch exprimiert sind. Die normale Transkriptvariante und die Transkriptvariante X1 sind mit Abstand am stärksten im Riechepithel exprimiert, während die Transkriptvariante X2 und die lncRNA besonders im Skelettmuskel und Herz auftreten. Darüber hinaus weisen die verschiedenen Analysen darauf hin, dass die Carnosin-Synthase in Rezeptorneuronen des Riechepithels exprimiert und axonal ins Riechhirn transportiert wird. Eine Diskrepanz zwischen der Enzymmenge und der Carnosin-Konzentration im Gewebe legt nahe, dass im Gegensatz zum Skelettmuskel im Nervengewebe ein sehr hoher Umsatz an Carnosin stattfindet. Dies lässt vermuten, dass Carnosin oder β -Alanin dort als Neurotransmitter oder Neuromodulator fungieren. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der Carnosin-Synthase im Riechhirn und die Carnosin-Konzentration im Skelettmuskel und Riechhirn von neugeborenen Mäusen nicht bzw. kaum detektierbar ist und in den ersten Monaten zunimmt. Im Riechhirn bleibt die Carnosin-Konzentration danach relativ stabil, während sie im Skelettmuskel im höheren Alter wieder abnimmt.

Um die enzymatische Reaktion der murinen Carnosin-Synthase näher zu untersuchen, wurde diese rekombinant in größeren Mengen exprimiert und eine nicht-radioaktive Methode zur Enzymaktivitätsbestimmung etabliert. Mit dieser war es möglich, Untersuchungen zur Enzymaktivität (K_m -Wert-Bestimmung für β -Alanin ($161,30 \pm 30,67 \mu\text{M}$), L-Histidin ($32,31 \pm 6,49 \mu\text{M}$) und ATP ($164,60 \pm 31,43 \mu\text{M}$)) und Substratspezifität der Carnosin-Synthase durchzuführen. Diese Methode würde sich auch für die Suche nach einem spezifischen Inhibitor der Carnosin-Synthase eignen. Da eine Carnosinase-Defizienz zu neurologischen Symptomen führt, könnte ein mögliches Anwendungsgebiet für einen solchen Inhibitor eine Substratreduktionstherapie sein.

2 Einleitung

2.1 Carnosin und verwandte Dipeptide

Carnosin ist ein Dipeptid, bestehend aus der nicht-proteinogenen Aminosäure β -Alanin und der proteinogenen Aminosäure L-Histidin. Es wurde bereits 1900 aus Liebigs Fleischextrakt isoliert (Gulewitsch, W. und Amiradzibi, 1900) und ist das erste Peptid, das aus tierischem Gewebe extrahiert wurde. Neben Carnosin gibt es noch andere imidazolhaltige Dipeptide, die ausschließlich im tierischen Gewebe vorkommen. Dazu gehören Homocarnosin (γ -Aminobutyryl-L-histidin), Anserin (β -Alanyl-3-methyl-L-histidin) und Ophidin bzw. Balenin (β -Alanyl-1-methyl-L-histidin). Sie setzen sich wie folgt zusammen:

Trivialname	Bezeichnung	Aminosäure 1	Aminosäure 2	Modifikation
Carnosin	β -Alanyl-L-histidin	β -Alanin	L-Histidin	-
Homocarnosin	γ -Aminobutyryl-L-histidin	GABA	L-Histidin	-
Anserin	β -Alanyl-3-methyl-L-histidin	β -Alanin	L-Histidin	N3-Methylierung
Ophidin / Balenin	β -Alanyl-1-methyl-L-histidin	β -Alanin	L-Histidin	N1-Methylierung

Die Strukturen dieser vier imidazolhaltigen Dipeptide sind in Abbildung 2.1 dargestellt. Ophidin bzw. Balenin wurde im Muskel von Schlangen bzw. Walen entdeckt und dementsprechend benannt (von Ophidia: Klade der Serpentes, Schlangen; *baleen whale*: engl. für Bartenwal). Erst später wurde festgestellt, dass es sich dabei um dasselbe Dipeptid handelt (Suyama und Maruyama, 1969). Die Bezeichnung Ophidin findet bevorzugt Anwendung und wird im Folgenden verwendet.

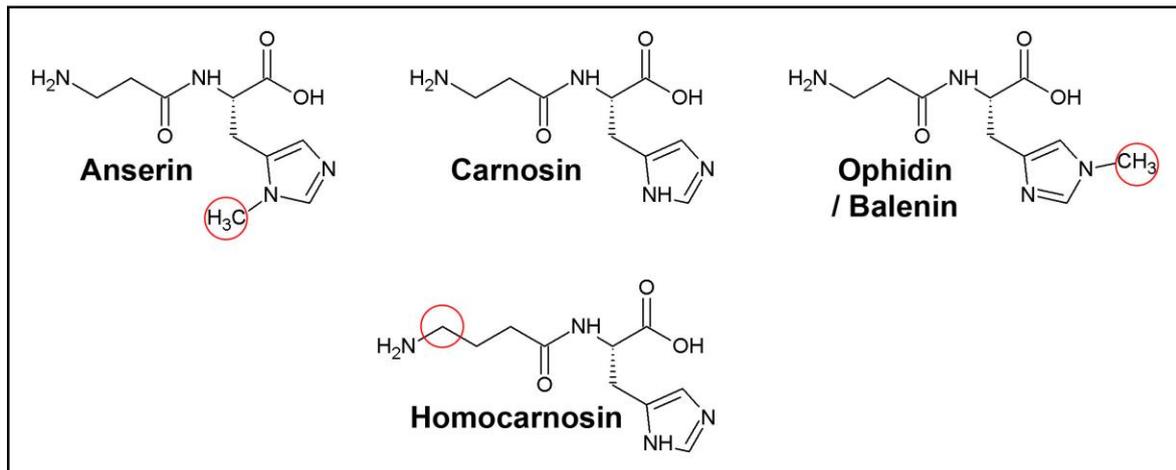


Abbildung 2.1 Struktur von Carnosin und verwandten Dipeptiden.

Dargestellt sind die Molekülstrukturen von Anserin (β -Alanyl-3-methyl-L-histidin), Carnosin (β -Alanyl-L-histidin) Ophidin/Balenin (β -Alanyl-1-methyl-L-histidin) und Homocarnosin (γ -Aminobutyryl-L-histidin). Die strukturellen Unterschiede von Anserin, Ophidin und Homocarnosin zu Carnosin sind mit roten Kreisen gekennzeichnet.

Ophidin wurde fast ausschließlich in Walen und Reptilien gefunden. Anserin dagegen ist im Muskel von Fischen, Vögeln und einigen Säugetieren das dominante der histidinhaltigen Peptide. Carnosin kommt in vielen Wirbeltieren vor (Crush, 1970) und konnte, ebenso wie Homocarnosin, bei den meisten Säugetieren nachgewiesen werden (Boldyrev et al., 2013). Auffallend hierbei ist, dass bei Säugetieren Carnosin und Anserin in hohen Konzentrationen im Skelettmuskel (Davey, 1960) und Homocarnosin in hohen Konzentrationen im zentralen Nervensystem gefunden wurde (Abraham et al., 1962).

Die höchsten Konzentrationen an Carnosin selbst wurden in Säugetieren in quergestreifter Muskulatur (~3-25 nmol/mg) (Davey, 1960) und in der Riechbahn (~1-2 nmol/mg) gemessen (Margolis, 1974).

2.2 Physiologische Funktion von Carnosin in Säugetieren

Obwohl schon seit über 100 Jahren Untersuchungen zur Funktion von Carnosin durchgeführt werden, konnte bis heute noch nicht endgültig geklärt werden, worin die physiologische Funktion des Dipeptids besteht. Auch für die anderen

verwandten Dipeptide konnte bisher noch keine eindeutige Funktion nachgewiesen werden, sie zeigen allerdings ähnliche physiologische Eigenschaften wie Carnosin. Es wird mittlerweile vermutet, dass Carnosin nicht in jedem Gewebe dieselbe Funktion ausübt und selbst in demselben Gewebe unterschiedliche Aufgaben hat. Im Folgenden werden nun einige der beschriebenen Funktionen von Carnosin dargestellt. Die meisten Untersuchungen wurden zur Funktion im Skelettmuskel durchgeführt, da es dort zuerst entdeckt wurde und in den höchsten Konzentrationen vorkommt.

2.2.1 Carnosin im Skelettmuskel

Da der pKs-Wert von Carnosin (6,72) ähnlich zum physiologischen pH-Wert ist, wird vermutet, dass es als Puffersubstanz für die im Muskel anfallende Milchsäure dient (Bate-Smith, 1938). Untersuchungen haben außerdem darauf hingewiesen, dass Carnosin die Sensitivität der Myofibrille für Ca^{2+} -Ionen erhöht, die bei einem Reiz aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum ausgeschüttet werden (Dutka und Lamb, 2004) und eine entscheidende Rolle bei der Muskelkontraktion spielen. In diesem Zusammenhang werden viele Untersuchungen an Sportlern durchgeführt, mit dem Ziel, die Carnosin-Konzentration im Muskel durch Nahrungsergänzung bzw. Nahrungsoptimierung zu erhöhen, um damit die Ausdauer oder Kraft positiv zu beeinflussen. Da β -Alanin eine nicht-proteinogene Aminosäure ist, und im Körper somit nicht durch den Abbau von Proteinen gewonnen werden kann, stellt es das limitierende Vorläufermolekül von Carnosin dar. Der endogene Weg auf dem β -Alanin vermutlich hauptsächlich entsteht, ist der hepatische Abbau der Pyrimidinbase Uracil (Traut und Loechel, 1984). β -Alanin kommt allerdings genauso wie Carnosin in hohen Konzentrationen im Skelettmuskel vor und kann auch durch fleischhaltige Nahrung aufgenommen werden. Es zeigte sich, dass Omnivoren, die regelmäßig Fleisch zu sich nehmen, eine höhere Carnosin-Konzentration im Skelettmuskel aufweisen als Vegetarier (Everaert et al., 2011). Die orale Verabreichung von β -Alanin steigert dabei die Carnosin-Konzentration im Skelettmuskel im gleichen Maße wie die Gabe von Carnosin (Harris et al., 2006).

2.2.2 Carnosin und Diabetes mellitus

Seit einiger Zeit gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass Carnosin eine protektive Rolle bei Diabetes-Erkrankungen spielt. So zeigten zum Beispiel Untersuchungen an einem Diabetes-Mausmodell (Streptozocin-induziert), dass eine Behandlung mit Carnosin den Blutzuckerspiegel senken und einige Begleiterscheinungen der Erkrankung wie Dyslipidämie und Leberschädigungen reduzieren kann (Soliman et al., 2007). Andere Untersuchungen ergaben, dass Carnosin zum Beispiel auch vor den Begleiterscheinungen wie der diabetischen Retinopathie (Netzhauterkrankung) (Pfister et al., 2011) oder der diabetischen Nephropathie schützt (Riedl et al., 2011). In *in vitro* Experimenten zum Katarakt (Linsentrübung), der auch durch Diabetes mellitus verursacht werden kann, konnte gezeigt werden, dass Carnosin die Aggregation von glykiertem α -Kristallin, dem Linsenprotein, wieder lösen kann (Seidler et al., 2004). Zudem wurde eine Korrelation zwischen der Carnosin-Konzentration im Blut und dem Insulin-Spiegel nachgewiesen (Sauerhöfer et al., 2007).

2.2.3 Carnosin als endogenes Antioxidans

Die antioxidativen Eigenschaften von Carnosin werden schon seit einigen Jahren untersucht (Boldyrev et al., 1988; Kohen et al., 1988). Die Erklärungen für diese Eigenschaft gehen hauptsächlich auf zwei Mechanismen zurück, die in zahlreichen *in vitro* Experimenten untersucht wurden. Diese sind zum einen die Fähigkeit von Carnosin, Metallionen zu chelatisieren und zum anderen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abzufangen. In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Carnosin mit Kupfer-Ionen interagiert (Brown, 1981; Dobbie und Kermack, 1955) und ein entsprechender Carnosin-Kupfer-Komplex konnte später spektrophotometrisch vermessen werden (Baran et al., 1995). Des Weiteren konnte eine Interaktion von Carnosin mit ROS wie Hyperoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) (alte Bezeichnung: Superoxid-Anionen) beobachtet werden und es zeigte sich eine ähnlich starke Interaktion wie bei Ascorbinsäure (Klebanov et al., 1997). Untersuchungen zum Mechanismus der Interaktion ergaben, dass er auf der Fähigkeit von Carnosin basiert, einen Elektronen-Donor-Akzeptor-Komplex

(*charge-transfer-complex*) mit dem Hyperoxid-Anion zu bilden und somit die Reaktivität des Hyperoxid-Anions zu reduzieren (Pavlov et al., 1993). Weitere Analysen wiesen nach, dass Carnosin auch in der Lage ist Hydroxyl-Radikale (HO·) abzufangen (Tamba und Torreggiani, 1998).

Neben den genannten *in vitro* Experimenten wurden auch zahlreiche *in vivo* Untersuchungen zur anti-oxidativen Wirkung von Carnosin durchgeführt. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Verabreichung von Carnosin bei Ratten die Lipidperoxidation senkt und die Aktivität mancher antioxidativ arbeitender Enzyme, wie die der Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase, erhöht (Kim et al., 2011).

Aufgrund der antioxidativen Eigenschaften von Carnosin wird dem Dipeptid auch eine altershemmende (*anti-aging*) Wirkung zugesprochen. So führte die Verabreichung von Carnosin in einem Mausmodell für Seneszenz (SAM; *senescence-accelerated mice*) zu einem Anstieg der durchschnittlichen Lebensdauer und einem verlangsamten Altern, was an der längeren Erhaltung des Fellglanzes, weniger Hautgeschwüren und einer besseren Reaktionsfähigkeit ausgemacht wurde (Boldyrev et al., 1999).

2.2.4 Carnosin und Herz-Kreislauf-System

Schon früh wurde postuliert, dass Carnosin eine hypotensive bzw. antihypertensive Wirkung bei Säugetieren hat (du Vigneaud und Hunt, 1936). Neuere *ex vivo*-Experimente zeigten dies nun an isolierten Aortengefäßen von Ratten. Nach Behandlung mit dem Vasokonstriktor Phenylephrin konnte Carnosin eine konzentrationsabhängige Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur herbeiführen (Ririe et al., 2000). Die Bildung eines Zink-Carnosin-Komplexes und die Beteiligung von Histamin-Rezeptoren scheinen eine Rolle bei der Kontraktion und Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur zu spielen (Miller und O'Dowd, 2000; O'Dowd und Miller, 1998). Carnosin könnte demnach eine Substanz zur Vasodilatation (Gefäßerweiterung) darstellen, wobei diskutiert wird, ob es auch endogen eine solche Funktion bei der Regulation des Blutdrucks hat.

2.2.5 Carnosin und Alzheimer-Krankheit

Ein möglicher positiver Effekt von Carnosin bei Morbus Alzheimer wurde zum ersten Mal in den späten 1990er Jahren vermutet. Untersuchungen ergaben damals, dass Carnosin *in vitro* die Akkumulation des β -Amyloid-Peptids durch sogenannte *advanced glycation endproducts* (AGEs) abschwächen kann (Münch et al., 1997). Später konnten die protektiven Eigenschaften von Carnosin gegenüber der toxischen Wirkung des akkumulierenden β -Amyloids in Zellkultur-Experimenten gezeigt werden (Preston et al., 1998). Neuere Experimente an einem Alzheimer-Mausmodell (3xTg-AD) demonstrierten, dass Carnosin die altersabhängig abnehmende mitochondriale Funktion wiederherstellen und die Akkumulation des β -Amyloids im Hippocampus weitestgehend verhindern kann. Es hat dabei aber keinen Effekt auf die Tau-Pathologie, die Ablagerung von fehlerhaft gefalteten Tau-Proteinen. Bei den kognitiven Defiziten konnte nur eine leichte Tendenz zur Verbesserung beobachtet werden (Corona et al., 2011). Erweiternd dazu wurden niedrigere Carnosin-Konzentrationen im Plasma von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen gefunden (Fonteh et al., 2007).

2.2.6 Carnosin im zentralen Nervensystem

Im Zusammenhang mit der postulierten antioxidativen Wirkung von Carnosin, (vergleiche Abschnitt 2.2.3), wird diskutiert, dass Carnosin und vor allem Homocarnosin, im Gehirn als endogene Antioxidantien wirken, da die Verfügbarkeit von anderen Antioxidantien (z. B. Glutathion, Vitamin C und E) dort nur sehr gering ist (Bonfanti et al., 1999).

Aufgrund der Tatsache, dass Carnosin in hohen Konzentrationen (~1-2 nmol/mg) auch in der Riechbahn (Riechhirn (*bulbus olfactorius*) und Riechepithel) vorkommt, wurde angenommen, dass das Dipeptid eine wichtige Rolle für den Geruchssinn spielt (Margolis, 1974). Wie auch für einige andere sensorische Wege, fungiert Glutamat als exzitatorischer Neurotransmitter zwischen den Riechsinneszellen (Rezeptorneurone) und den Nervenzellen im Riechhirn. Untersuchungen haben

gezeigt, dass Carnosin und Glutamat in den synaptischen Endigungen dieser Rezeptorneurone kolokalisiert sind (Sassoè-Pognetto et al., 1993). In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass Carnosin als Neurotransmitter oder Neuromodulator für den Geruchssinn dient.

Erweiternd dazu wird postuliert, dass nicht Carnosin, sondern β -Alanin als Neurotransmitter fungiert, da es ein strukturelles Intermediat zwischen den Neurotransmittern GABA (γ -Aminobuttersäure) und Glycin darstellt und wesentliche Voraussetzungen als Neurotransmitter erfüllt (Tiedje et al., 2010). Zum einen kommt es von Natur aus im zentralen Nervensystem vor und zum anderen wurde gezeigt, dass es in einem Kalzium-abhängigen Prozess durch elektrische Stimulation freigesetzt wird und die neuronale Erregbarkeit inhibiert. Carnosin würde nach dieser Hypothese als Reservoir für β -Alanin dienen und bei Bedarf in β -Alanin und L-Histidin gespalten werden, um somit β -Alanin freizusetzen (Van Kuilenburg et al., 2004).

2.3 Synthese und Abbau von Carnosin

Peptide können auf zwei grundlegend verschiedenen Wegen synthetisiert werden. Die meisten Peptide entstehen durch ribosomale Synthese über die Translation einer *messenger* RNA (mRNA) am Ribosom mit anschließender proteolytischer Prozessierung zum reifen Peptid. Einige andere Peptide, die nicht-ribosomalen Peptide (NRP), werden durch ihre mehr oder weniger spezifischen Peptid-Synthasen gebildet (Marahiel et al., 1997). Die Verknüpfung der Aminosäuren geschieht hierbei meistens in einem Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Prozess. Durch diesen Syntheseweg ist auch der Einbau von nicht-proteinogenen Aminosäuren in Peptide möglich. Mikroorganismen und Pilze nutzen diesen Weg, um Sekundärmetabolite wie Toxine und Antibiotika zu bilden (Finking und Marahiel, 2004). Im Vergleich zu Mikroorganismen und Pilzen sind in Säugetieren nur wenige Peptid-Synthasen bekannt.

Carnosin ist ein solches nicht-ribosomales Peptid und wird durch die ATP-abhängige Carnosin-Synthase (Carns1; EC 6.3.2.11) aus den Aminosäuren

β -Alanin und L-Histidin gebildet, wie in Abbildung 2.2 dargestellt ist. ATP wird dabei zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P_i) hydrolysiert.

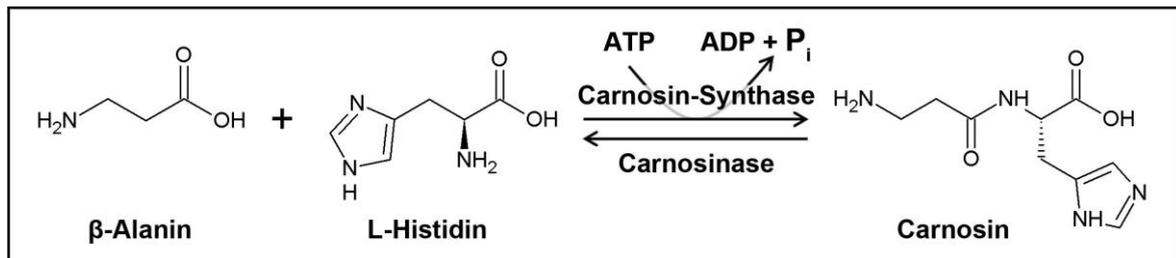


Abbildung 2.2 Synthese von Carnosin aus β -Alanin und L-Histidin.

Schematische Darstellung der Synthese des Dipeptids Carnosin aus dessen Bestandteilen β -Alanin und L-Histidin. Katalysiert wird die Reaktion durch die Carnosin-Synthase, die dabei ATP in ADP und P_i hydrolysiert. Die Carnosinase spaltet in der Abbaureaktion Carnosin in β -Alanin und L-Histidin. ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, P_i = anorganisches Phosphat.

Die Synthese des Dipeptids Anserin (β -Alanyl-3-methylhistidin) (vergleiche Abbildung 2.1) erfolgt durch die Methylierung von Carnosin, katalysiert von der Carnosin-N-Methyltransferase (Drozak et al., 2013). Das ebenfalls verwandte Dipeptid Homocarnosin (γ -Aminobutyryl-L-histidin) (vergleiche Abbildung 2.1) wird auch von der Carnosin-Synthase synthetisiert, allerdings insbesondere bei Säugetieren mit einer niedrigeren Effizienz als Carnosin (Drozak et al., 2010).

Carnosin-Synthase-defiziente Mäuse (*Carns1-knock-out*) zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp und sind zunächst auch neurologisch unauffällig. Sie haben eine normale Fertilität und Lebenserwartung, allerdings stehen detaillierte Analysen noch aus (persönliche Mitteilung von Dr. Matthias Eckhardt). Bislang wurde zum Beispiel nicht untersucht, ob es bei ausgiebiger Muskelbeanspruchung zu einer früheren oder stärkeren Azidose kommt oder welche Auswirkung ein erhöhter oxidativer Stress hat.

Der Abbau von Carnosin wird von der Carnosinase katalysiert, die Carnosin wieder in seine beiden Bestandteile β -Alanin und L-Histidin spaltet. Es wurde gezeigt, dass es in Säugetieren zwei Enzyme (EC 3.4.13.18 und EC 3.4.13.20)

gibt, die Carnosin abbauen. Sie werden von unterschiedlichen Genen kodiert und wurden 2003 als Mitglieder der Metalloprotease-Familie identifiziert.

Die erste der beiden Carnosinasen (CN1, EC 3.4.13.20) ist eine spezifische Carnosinase, früher auch „Serum-Carnosinase“ genannt, die Carnosin und Homocarnosin spaltet. Beim Menschen wird sie hauptsächlich in Gehirn, Nieren und Leber produziert und in den Blutkreislauf sekretiert. Bei Mäusen wurde das Ortholog in den Nieren nachgewiesen, aber nicht im zentralen Nervensystem. Die zweite Carnosinase (CN2, EC 3.4.13.18), früher auch „Gewebe-Carnosinase“ genannt, ist ein Mn^{2+} -abhängiges cytosolisches Enzym, das „cytosolische unspezifische Dipeptidase“ genannt wird, da es auch einige andere Dipeptide spalten kann und in vielen humanen und murinen Geweben exprimiert ist. (Teufel et al., 2003)

Eine Defizienz der Carnosinase (CN1) führt zu einem erhöhten Carnosin-Spiegel im Blut (Carnosinemia) und im Urin (Carnosinuria) und ist mit neurologischen Störungen verbunden (Perry et al., 1968). Berichtete Symptome von Patienten mit Carnosinase-Defizienz oder verminderter Carnosinase-Aktivität sind mentale Retardierung, Hypotonie, myoklonische Anfälle und spastische Paraplegie. Da die Carnosinase aus der Leber ins Blut sekretiert wird, lässt sich auch erklären, dass Patienten mit einer ausgeprägten Leberschädigung ebenfalls einen erhöhten Carnosin-Spiegel im Blut aufweisen. Bis heute gibt es noch keine Erklärung für den Zusammenhang zwischen der Carnosinase-Aktivität und den neurologischen Symptomen.

2.4 Carnosin-Synthase

Die Carnosin-Synthase wurde erst 2010, über 100 Jahre nach Entdeckung des Carnosins, als das *ATP-grasp domain-containing protein 1* (ATPGD1) identifiziert (Drozak et al., 2010) und gehört zur Familie der ATP-Grasp-Enzyme. Diese besitzen eine atypische ATP-Bindespalte, die aus zwei α - und zwei β -Domänen besteht (Murzin, 1996) mit denen das ATP „gegriffen“ wird. Aufgrund der Zugehörigkeit zur ATP-Grasp-Familie wird vermutet, dass bei der Synthese von

Carnosin zunächst β -Alanin durch Phosphorylierung aktiviert und dann auf L-Histidin übertragen wird (Fawaz et al., 2011). Bei der Carnosin-Synthase handelt es sich um ein lösliches, cytosolisches Enzym (Drozak et al., 2010), das Mg^{2+} als Cofaktor benötigt (Kalyankar und Meister, 1959).

Das Gen für die Carnosin-Synthase der Maus kodiert für eine mRNA, die aus 10 Exons besteht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/107239>, Stand April 2016). Davon ist das erste nicht-kodierend und das zweite enthält lediglich das Startcodon. Exon 10 ist das am höchsten konservierte und enthält die Sequenz für die ATP-Grasp-Domäne (Drozak et al., 2010). In Abbildung 2.3 ist schematisch die Struktur der mRNA dargestellt.

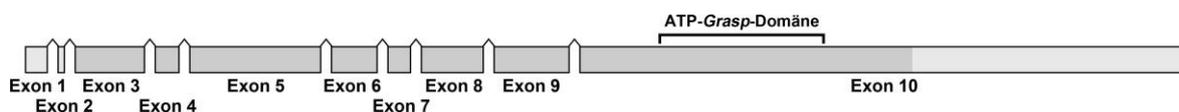


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der mRNA-Struktur der murinen Carnosin-Synthase.

Die mRNA der murinen Carnosin-Synthase besteht aus 10 Exons, wobei das erste nicht-kodierend ist und das zweite nur das Startcodon enthält. Exon 10 enthält die Sequenz für die ATP-Grasp-Domäne und ist das höchst-konservierteste. In Dunkelgrau ist der kodierende Bereich der mRNA dargestellt.

Das murine Enzym besteht aus 947 Aminosäuren (errechnetes Molekulargewicht ~102 kDa) und ist damit sehr viel größer als es für ein Mitglied der ATP-Grasp-Familie zu erwarten wäre. Sequenzvergleiche zeigten, dass auch der N-terminale Teil des Enzyms Homologien zu einer ATP-Grasp-Domäne aufweist, woraus geschlossen wurde, dass die Carnosin-Synthase von einem Protein abgeleitet ist, das zwei ATP-Grasp-Domänen enthielt (Drozak et al., 2010). Die höhere Konservierung des C-terminalen Teils des Enzyms deutet allerdings darauf hin, dass dieser Abschnitt die katalytische Aktivität besitzt.

2.5 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die murine Carnosin-Synthase charakterisiert werden, um die physiologische Funktion des Dipeptids Carnosin weiter aufzuklären. Dies sollte durch Untersuchungen zur Expression des Enzyms sowohl auf Transkriptebene als auch auf Proteinebene in Mausmodellen geschehen. Weiterhin sollten Analysen bezüglich der Lokalisation des von Carnosin-Synthase gebildeten Dipeptids Carnosin erfolgen, insbesondere im Hinblick auf gewebe- und altersspezifische Unterschiede. Um die enzymatische Aktivität der Carnosin-Synthase genauer untersuchen zu können, sollte eine nicht-radioaktive Methode zur *in vitro* Enzymaktivitätsbestimmung etabliert werden.

3 Material

3.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Gelsystem Mini L	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Chemilumineszenz-Detektionssystem	Fusion Solo (Software: Capt Advance Solo 4)	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
DC-Auftragsgerät	Automatic TLC sampler 4 (Software: winCATS V 1.2.1)	Camag, Muttenz, Schweiz
Dispergiergerät	Ultra-Turrax T25 / T10	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Elektrophoresekammer (RNA)	MUPID-exU	Mupid CO., Tokio, Japan
Elektrotransferkammer	Perfect Blue [™] 'Semi-Dry'-Blotter, Sedec [™]	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100M (Software: Axio Vision 4)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kryostat	CM 1510 S	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Laserscanmikroskop	LSM 800 Airyscan (Software: Zen 2 blue)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microplatten-Messgerät	GENios (Software: XFluor 4)	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Microplatten-Messgerät	Infinite Pro 2000 (Software: i-control [™])	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Mikrotom	Leica RM2155	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Paraffiniermaschine	Tissue Tek VIP Jr.	Sakura Finetek, Tokio, Japan

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
PCR-Maschine	T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
<i>Real-Time</i> PCR-Maschine	7300 Real Time PCR System (Sequence detection software version 1,4)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Schüttelinkubator	Ecotron	INFORS HAT, Basel, Schweiz
SDS-Gelelektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
SDS-Gelelektrophoresekammer	Perfect Blue™ Doppel-Gelsystem Twin ExW S	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Spectrophotometer	NanoDrop 2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vakuumzentrifuge	ScanSpeed 40	ScanVac, Labogene, Lyngø, Dänemark

3.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Roche-Applied-Science (Mannheim, Deutschland), BIO-RAD (Hercules, CA, USA), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Fluka Chemikalien Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.3 Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und Invitrogen (San Diego, USA) bezogen. Alle Materialien für Western Blot-Analysen kamen von der Firma Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland). Alle anderen Verbrauchsmaterialien wurden von

den Firmen Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland), Greiner bio-one (Frickhausen, Deutschland), BD (Beckton Dickinson, CA, USA), BIO-RAD (Hercules, CA, USA), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Thermo Fischer Scientific (Rockford, USA) bezogen.

3.4 Puffer, Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coomassie-Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Lösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250
Dialysepuffer	50 mM Hepes 10 mM KCl pH 7,4
Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl 150 mM Imidazol pH 7,4
Entwicklungspuffer (<i>in situ</i>)	100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Entwicklungspuffer (Northern Blot)	100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM NaCl

Bezeichnung	Zusammensetzung
Equilibrierungspuffer	50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 7,4
Homogenisierungspuffer	250 mM Saccharose 10 mM HEPES 1 mM EDTA (pH 8) 2 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Pepstatin 100 µg/ml Pefabloc® SC pH 7,4
Hybridisierungslösung (<i>in situ</i>)	10 % (w/v) Dextransulfat 10 % (v/v) Hybridisierungssalz 50 % (v/v) Formamid 2 % (v/v) 50x Denhardt-Lösung 0,2 % (w/v) SDS 0,25 mg/ml ssDNA aus Lachs-Hoden
Hybridisierungssalz	3 M NaCl 0,1 M PIPES 0,1 M EDTA
kolloidale Coomassie-Lösung	10 % (v/v) Ethanol 5 % (w/v) Aluminiumsulfat-(14-18)hydrat 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250
Ladepuffer L-IV	0,25 mM Bromphenolblau 30 % (w/v) Glycerin 10 mM Tris-HCl pH 7,0

3 Material

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Agarplatten	NaCl (3 g/l) Hefeextrakt (10 g/l) Trypton (5 g/l) 1,5 % (w/v) Agarose pH7,4 ggf. Ampicillin (100 µg/ml) ggf. Kanamycin (20 µg/ml)
LB-Medium	NaCl (10 g/l) Hefeextrakt (10 g/l) Trypton (5 g/l) pH 7,0 ggf. Ampicillin (100 µg/ml) ggf. Kanamycin (20 µg/ml)
Lysepuffer	20 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 2 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Pepstatin 100 µg/ml Pefabloc® SC pH 8,0
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 2,5 mM KCl pH 7,4

Bezeichnung	Zusammensetzung
PNP-Reaktionspuffer (20x)	1 M Tris-HCl 20 mM MgCl ₂ 2 mM Natriumazid pH 7,5
Ponceau S-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % (v/v) Trichloressigsäure
RNA-Laufpuffer (5x)	0,1 M MOPS pH 7,0 40 mM Natriumacetat 5 mM EDTA pH 8
SDS-Laufpuffer	250 mM Tris-HCl 1,9 M Glycin 1 % (w/v) SDS pH 8,6
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
TAE-Puffer	50 mM Tris-HCl 2 mM EDTA 20 mM Natriumacetat pH 8,0
TBS	10 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl
TBS-T	TBS + 0,05 % (v/v) Tween 20

3.5 Lösungen und Medien für die Bakterienkultivierung

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Agarplatten	NaCl (3 g/l) Hefeextrakt (10 g/l) Trypton (5 g/l) 1,5 % (w/v) Agarose pH7,4 ggf. Ampicillin (100 µg/ml) ggf. Kanamycin (20 µg/ml)
LB-Medium	NaCl (10 g/l) Hefeextrakt (10 g/l) Trypton (5 g/l) pH 7,0 ggf. Ampicillin (100 µg/ml) ggf. Kanamycin (20 µg/ml)

3.6 Medien für die Zellkultur

Bezeichnung	Kultivierung von	Zusätze
Express Five ® SFM	<i>High Five</i> -Zellen	20 mM Glutamine 10 µg/ml Gentamycin
Sf-900 III SFM	Sf-9-Zellen	

3.7 Enzyme und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
10x DIG RNA <i>labeling</i> Mix	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DNase I (RNase-frei)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Phusion® DNA-Polymerase	Finnzymes, Vantaa, Finnland
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
<i>SuperScript® II Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen, San Diego, USA
T3 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
T7 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
<i>Tobacco etch virus</i> (TEV)-Protease	Expression in <i>E.coli</i> , Dr. Matthias Eckhardt

3.8 Kits

Bezeichnung	Hersteller
EnzCheck® Phosphate Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>SYBR® Select Master Mix</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA

3.9 Größenstandards für Gelelektrophoresen

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
RiboRuler High Range RNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland

3.10 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden in den hier durchgeführten Western Blot (WB)- und Immunfluoreszenz (IF)-Analysen verwendet.

(*) Antiserum gegen GST-Fusionsprotein, das rekombinant in *E. coli* exprimiert wurde (Saile, 2011) mit anschließender Affinitätsreinigung gegen HST-Carns1, die rekombinant in *High Five*-Zellen exprimiert wurde.

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Herkunft	Konz.
gp-a-Carns1-C	Meer-schweinchen	C-terminaler Teil (Exon10) der murinen Carns1	Affinitäts-gereinigtes Antiserum (*)	WB: 1:1.000 IF: 1:250
rb-a-Carnosin	Kaninchen	Carnosin	Abcam, ab36953 Lot: GR86343-2	IF: 1:250
rb-a-OMP	Kaninchen	olfaktorisches Markerprotein	Abcam, ab62609 Lot: GR26517-9	IF: 1:250
ms-a-His	Maus	6xHistidin	Invitrogen, MA1-21315	WB: 1:5.000

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Hersteller	Konz.
Alexa647-a-gp	Ziege	IgG Meer-schweinchen	Invitrogen, A21450	IF: 1:400
Cy3-a-gp	Ziege	IgG Meer-schweinchen	Dianova, 106-165-003	IF: 1:500
Cy3-a-rb	Ziege	IgG Kaninchen	Dianova, 111-165-144	IF: 1:500
POX-a-gp	Ziege	IgG Meer-schweinchen	Dianova, 106-035-003	WB: 1:5.000
POX-a-ms	Ziege	IgG + IgM Maus	Dianova, 115-035-044	WB: 1:5.000

3.11 Plasmide und Vektoren

Interne Nummer	Bezeichnung	Beschreibung
E153	pBluescript SK(-) (pBSK)	bakterieller Klonierungsvektor; Ampicillin-Resistenzkasette
E287	pEGFP-Carns1	Ausgangsvektor pEGFP-C1; kodiert murine Carns1 mit N-terminal fusioniertem EGFP; CMV-Promotor; Kanamycin / Neomycin-Resistenzkasette
E389	pBSK-Carns1-Ex4-8-rev	bakterieller Klonierungsvektor; Ampicillin-Resistenzkasette; T3- und T7-Promotor für <i>in vitro</i> -Transkription; enthält einen Teil (Ex4-8) der cDNA der murinen Carns1 (424-1254 bp)
E411	pUBac1-HST	Baculovirus-Expressionsvektor basierend auf pUltraBac1; His-Tag, Twin-Strep-Tag® und TEV-Protease-Schnittstelle (HST-Tag) mit PH-Promotor; EGFP-Gen mit <i>basic</i> -Promotor; Ampicillin-Resistenzkasette
E431	pUBac1-HST-Carns1	Baculovirus-Expressionsvektor basierend auf pUBac1-HST; murine Carns1 mit N-terminal fusioniertem HST-Tag; PH-Promotor; EGFP-Gen mit <i>basic</i> -Promotor; Ampicillin-Resistenzkasette

3.12 Oligonukleotide

#	Interne Nummer	Name	Sequenz	Verwendung
1	L-3734	Carns1-Ex4-8-Xbal-for	5'-GATCTCTAGACCTTCC TATCTCTGTTGCTGG-3'	Klonierung von pBSK-Carns1-Ex4-8-rev (E389)
2	L-3735	Carns1-Ex4-8-Sall-rev	5'-GATCGTCGACCTTGG CAGGGTATAGTGGT-3'	Klonierung von pBSK-Carns1-Ex4-8-rev (E389)
3	L-3977	qRps2-for	5'-CTGACTCCCAGACCTCTGGAAA-3'	<i>real-time</i> PCR: ribosomales Protein S2
4	L-3978	qRps2-rev	5'-GAGCCTGGGTCCTCTGAACA-3'	<i>real-time</i> PCR: ribosomales Protein S2
5	L-3607	Carns1-for	5'-GCGCGGGACTACGGACTGAC-3'	<i>real-time</i> PCR: Carnosin-Synthase (alle Varianten)
6	L-3608	Carns1-rev	5'-CCCTCCGGTGCTCAGTCACA-3'	<i>real-time</i> PCR: Carnosin-Synthase (alle Varianten)
7	L-4075	Carns1 X0-for	5'-ACCTCCAAGATGCTCTGCCT-3'	<i>real-time</i> PCR: Carnosin-Synthase
8	L-4077	Carns1 X0-rev	5'-CCCTTGCAATCCAGGCTGATA-3'	<i>real-time</i> PCR: Carnosin-Synthase
9	L-4067	Carns1 X1-for	5'-GTTTCATAGATCAGGCTGCCC-3'	<i>real-time</i> PCR: Carnosin-Synthase (X1)
10	L-4069	Carns1 X1-rev	5'-CATGTTTCCAGGGCTCTGG-3'	<i>real-time</i> PCR: Carnosin-Synthase (X1)
11	L-4071	Carns1 X2-for	5'-GAGTAGGGGGAAACATGCTC-3'	<i>real-time</i> PCR: Carnosin-Synthase (X2)
12	L-4058	Carns1 X2-rev	5'-AAGCTCACAGCCTTAGAGACC-3'	<i>real-time</i> PCR: Carnosin-Synthase (X2)

#	Interne Nummer	Name	Sequenz	Verwendung
13	L-4080	lncRNA-for	5'-TGCCAGGAACTGAAGATCATTG-3'	real-time PCR: lncRNA
14	L-4048	lncRNA-rev	5'-TGCATATTCTGTGGAGCTGAAA-3'	real-time PCR: lncRNA

3.13 Bakterienstämme

Bezeichnung	Chromosomaler Genotyp
<i>E. coli</i> DH10 Bac	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> /pMON14272/pMON7124
<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> +, <i>lacI2lacZ</i> ΔM15 Tn10 (<i>tetrr</i>)]

3.14 Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller
High Five™	Invitrogen, B855-02
Sf-9	Invitrogen, B825-01

3.15 Mauslinien

Genetischer Hintergrund: 129/Ola x C57BL/6

- Wildtyp-Maus: Carns1^{tm1Meck} (+/+)
- Carns1-heterozygot-Maus: Carns1^{tm1Meck} (+/-)
- Carns1-knock-out-Maus: Carns1^{tm1Meck} (-/-)

3.16 Software und Datenbanken

- GraphPad Prism 6
- AIDA Image Analyzer
- Clone Manager 9.0
- ChemSketch, ACDLABS 12.0
- NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Ensembl (www.ensembl.org)
- Zen Imaging Software (blue edition)
- AxioVision

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um einen definierten DNA-Abschnitt mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase *in vitro* zu vervielfältigen (Mullis et al., 1986). Dabei werden DNA als Matrize, Oligonukleotide, die den zu amplifizierenden Bereich flankieren, eine DNA-Polymerase, Desoxynukleotide (dNTPs) und geeignete Pufferbedingungen benötigt. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen:

Komponente	Menge
Matrizen-DNA (~10 ng/μl)	1 μl
Oligonukleotid 1 (10 pmol/μl)	1 μl
Oligonukleotid 2 (10 pmol/μl)	1 μl
Phusion® buffer HF (5 x)	10 μl
dNTPs (2 mM)	5 μl
Phusion® DNA-Polymerase (2 U/μl)	0,5 μl
dH ₂ O	Ad 50 μl

Die eigentliche Reaktion besteht aus drei Schritten, in denen die Temperatur verändert wird. Zunächst wird die DNA auf 95 °C erhitzt, um die Doppelstränge voneinander zu trennen. Danach wird die Temperatur auf die *Annealing*-Temperatur (58 – 62 °C) gesenkt. Dabei lagern sich die Oligonukleotide an den komplementären Teil der DNA an. Der letzte Schritt ist die Elongationsphase (72 °C), in der die DNA-Polymerase ausgehend von den Oligonukleotiden ein Desoxynukleotid nach dem anderen, komplementär zur Matrizen-DNA, anknüpft. Diese drei Schritte werden ca. 30-mal wiederholt, wodurch der entsprechende DNA-Abschnitt vervielfältigt wird.

Temperatur	Dauer	
98 °C	30 s	} 30 Zyklen
98 °C	20 s	
58 - 62 °C *	30 s	
72 °C	30 - 90 s **	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

pBSK-Carns1-Ex4-8-rev: * 62 °C ** 30 s

pUBac1-HST-Carns1: * 58 °C ** 90 s

Die *Annealing*-Temperatur liegt knapp unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide, die sich nach deren Länge und GC-Gehalt richtet. Die zwei Oligonukleotide sollten so gestaltet sein, dass sich ihre Schmelztemperaturen ähneln. Die Elongations-Temperatur richtet sich nach dem Temperatur-Optimum der verwendeten Polymerase und die Dauer der Elongationsphase nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem *Qiagen PCR Purification Kit®* nach Herstellerangaben gereinigt.

4.1.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und diese durch Trennung der Phosphodiesterbindung spalten. Diese Methode wurde verwendet, um definierte DNA-Fragmente zur Klonierung eines Vektors (~2 µg) oder für die *in vitro* Transkription (~6 µg) zu erhalten (präparativ), aber auch, um DNA-Analysen durchzuführen (analytisch). Es wurde dabei wie folgt vorgegangen:

Komponente	präparativ	analytisch
DNA	~2 - 6 µg	~1 µg
10 x Puffer	4 µl	2 µl
Restriktionsendonukleasen (10 U/µl)	1 µl	0,5 µl
dH ₂ O	Ad 40 µl	Ad 20 µl

Bei einem Restriktionsverdau mit nur einer Restriktionsendonuklease wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet. Bei einem Restriktionsverdau mit mehreren Restriktionsendonukleasen wurde der Puffer verwendet, in dem alle Enzyme eine möglichst hohe Aktivität aufweisen. Der Restriktionsansatz wurde für 2 h (präparativ) bzw. 30 min (analytisch) bei 37 °C inkubiert.

4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, bei der DNA ihrer Größe nach aufgetrennt wird. Sie beruht auf der unterschiedlich schnellen Wanderung der negativ-geladenen DNA durch eine Agarose-Matrix in einem elektrischen Feld. Hierfür wurden 1 – 2 % ige (w/v) Agarosegele (in 1x TAE-Puffer + 0,5 – 2 µg/ml Ethidiumbromid) hergestellt, die Proben mit Ladepuffer (L-IV) versetzt und in die Agarosegeltaschen überführt. Die Größenauftrennung erfolgte in einer mit 1 x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer bei 100 – 120 V. Unter UV-Licht (260 nm) kann anschließend die DNA sichtbar gemacht werden und anhand eines DNA-Markers die Größe der DNA-Fragmente eruiert werden.

Um DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des *Qiagen Gel Extraction Kits* nach Herstellerangaben gereinigt.

4.1.4 Phenol/Chloroform-Fällung

Durch eine Phenol/Chloroform-Fällung kann DNA gereinigt werden, indem Verunreinigungen von Proteinen entfernt werden. Dies ist besonders wichtig, um Kontaminationen mit RNasen zu eliminieren, um anschließend RNase-frei zu arbeiten. 200 µl DNA wurden dafür mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und für 20 s kräftig gemischt. Nach Zentrifugation (18.000 g; 25 min) wurde die obere (wässrige) Phase abgenommen und mit 200 µl Chloroform vermischt, bevor die Probe erneut zentrifugiert wurde (18.000 g; 25 min). Die obere (wässrige) Phase wurde abgenommen und die DNA durch Zugabe von Natriumacetat (3 M; 1/10 Volumen) und Ethanol (100 % (v/v); -20 °C; 2,5 Volumen) gefällt. Nach Zentrifugation (18.000 g; 30 min; 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl Ethanol (70 % (v/v); -20 °C) gewaschen. Die Probe wurde erneut zentrifugiert (18.000 g; 15 min; 4 °C), der Überstand verworfen und das getrocknete Pellet in 15 µl dH₂O gelöst.

4.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Ligation können lineare DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden. Die T4-DNA-Ligase knüpft dabei eine neue Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-Hydroxyende und einem 5'-Phosphatende. Die Verknüpfung kann sowohl bei überhängenden als auch bei nicht-überhängenden Enden geschehen. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen:

Komponente	Menge
Vektor-DNA	20 ng
Fragment-DNA	Abhängig vom Größenverhältnis
T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
dH ₂ O	Ad 20 µl

Für die Ligation von einem kleineren Fragment in einen größeren Vektor wurde das optimale Verhältnis zwischen der Fragment- und Vektor-Menge mit folgender Formel für überhängende Enden berechnet. Die eingesetzte Vektormasse betrug 20 ng.

$$m(\text{Fragment}[\text{mg}]) = \frac{m(\text{Vektor}[\text{ng}]) * l(\text{Fragment}[\text{bp}]) * 3}{l(\text{Vektor}[\text{bp}])}$$

Der Ligationsansatz wurde entweder über Nacht bei 16 °C oder für 3 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

4.1.6 Transformation von *E.coli* XL1 blue

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterien. Durch ein Resistenzgen für ein bestimmtes Antibiotikum, das sich auf der Plasmid-DNA befindet, kann anschließend auf die erfolgreich transformierten Bakterien selektioniert werden. Bei den hier verwendeten chemisch kompetenten Zellen handelte es sich um *E.coli* XL1 blue. 100 µl kompetente Zellen wurden zunächst 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 5 µl des Ligationsansatzes oder ~1 ng Plasmid-DNA wurden die Zellen für weiter 15 min auf Eis inkubiert, bevor sie für 60 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt wurden. Anschließend wurden sie 2 min auf Eis inkubiert und dann in 1 ml LB-Medium (37 °C) überführt. Nach einstündiger Inkubation im 37 °C-Schüttler wurden dann 100 µl auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das *Qiagen Plasmid Miniprep Kit* bzw. für größere Mengen das *Qiagen Plasmid Midiprep Kit* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers.

4.1.8 Transformation von *E.coli* DH10 Bac

Die Transformation von *E.coli* DH10 Bac mit Plasmid-DNA wird dazu verwendet um rekombinante Bacmid-DNA zu produzieren. Diese kann anschließend isoliert werden. Für die Transformation werden chemisch kompetente Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und in ein 12 ml-Rundboden-Gefäß überführt. Die Plasmid-DNA (~1 ng) wird zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 45 s auf 42 °C im Wasserbad erhitzt und direkt für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von ~900 µl S.O.C.-Medium (Invitrogen™) wurden die Zellen für 4 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert, auf LB-Platten mit Kanamycin (50 µg/ml), Gentamicin (7 µg/ml), 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal; 10 µg/ml) und Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; 40 µg/ml) ausgestrichen und für ~48 h bei 37 °C inkubiert.

4.1.9 Isolierung von Bacmid-DNA

Nach Transformation der Plasmid-DNA in *E.coli* DH10 Bac wurden weiße Kolonien aufgenommen und erneut auf LB-Platten mit Kanamycin, Gentamicin, X-Gal und IPTG vereinzelt. Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37 °C wurden einzelne weiße Kolonien in je 5 ml LB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und Gentamicin (7 µg/ml) aufgenommen und für 24 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Je 1,5 ml der Bakterienkultur wurden anschließend abzentrifugiert (15.000 g; 1 min; RT), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 300 µl P1-Puffer (15mM Tris-HCl 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl P2-Puffer (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) zugegeben, gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl P3-Puffer (3 M Kaliumacetat, pH 5,5), wurde das Gemisch geschüttelt, für 5 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (14.000 g; 10 min; 4 °C). In ein frisches Reaktionsgefäß wurden 800 µl Isopropanol vorgelegt und der Überstand hinzugegeben. Das Gefäß wurde mehrfach invertiert, 5 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (14.000 g; 15 min; RT). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Bacmid-DNA-Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (14.000 g; 5 min; RT) und der Überstand unter

sterilen Bedingungen verworfen. Das Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und die Bacmid-DNA in 40 µl dH₂O aufgenommen. Die Bacmid-DNA wurde abschließend mittels PCR-Analysen und ggf. Sequenzierung überprüft.

4.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte mit dem *NanoDrop 2000* und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.1.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

4.1.12 RNA-Extraktion (Chomczynski und Sacchi, 1987)

Alle Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich mit RNase-freien Reagenzien und Materialien durchgeführt, um RNA-Abbau durch RNasen zu vermeiden.

Um RNA aus Gewebe zu extrahieren wurde dieses in TRIzol[®] mit einem Dispergiergerät dreimal 20 s homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (12.000 g; 10 min; 4 °C) und der Überstand mit BCP (1-Bromo-3-Chloro-Propan) versetzt (1/10 des TRIzol[®]-Volumens). Nach 1 min kräftigem Mischen und 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert (12.000 g; 10 min; 4 °C). Um die RNA zu fällen, wurde nun der wässrigen Überstand mit Isopropanol versetzt, kräftig gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und abzentrifugiert (12.000 g; 10 min; 4 °C). Das Pellet wurde anschließend mit Ethanol (75 % (v/v)) gewaschen, kurz getrocknet und dann in dH₂O gelöst.

4.1.13 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgt durch eine reverse Transkriptase. Diese verwendet RNA als Matrize, wodurch die entstehende cDNA dann komplementär zur eingesetzten RNA ist. Setzt man in der cDNA-Synthese-Reaktion Oligo(dT)-Nukleotide ein, werden nur die eukaryontischen mRNA-Moleküle in cDNA übersetzt, da nur diese einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende besitzen.

Die hier verwendete RNA wurde zunächst mit dem *Qiagen RNeasy Mini* bzw. *Micro Kit* nach Herstellerangaben gereinigt. Für die anschließende cDNA-Synthese wurde die *SuperScript® II Reverse Transcriptase* von Invitrogen verwendet.

Die RNA wurde auf 10 µl mit dH₂O aufgefüllt und mit 1 µl Oligo(dT)-Nukleotide (50 µM) versetzt. Nach Inkubation bei 65 °C für 10 min und Abkühlen auf 4 °C wurde der folgende Reaktionsansatz dazugegeben und für 2 min bei 42 °C inkubiert.

Komponente	Menge
<i>First-Strand-Buffer</i> (5x)	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
dH ₂ O	1 µl

Nach erneutem Abkühlen auf 4 °C wurde zuletzt die *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (1 µl) hinzugegeben und für 1 h bei 42 °C und anschließend für 15 min bei 72 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf 4 °C wurde die cDNA 1:5 in dH₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

4.1.14 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR ist eine Methode mit der die Expression von spezifischer mRNA im Gewebe quantitativ analysiert werden kann. Die hier

angewandte quantitative *real-time* PCR wurde mithilfe des *SYBR[®] Select Master Mix* von Applied Biosystems in einer Mikrotiterplatte (96-well) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen:

Komponente	Menge
cDNA	5 µl
dH ₂ O	3 µl
Oligonukleotid vorwärts (10 µM)	1 µl
Oligonukleotid rückwärts (10 µM)	1 µl
<i>SYBR[®] Select Master Mix</i>	10 µl

Temperatur	Dauer	
50 °C	120 s	} 40 Zyklen
95 °C	120 s	
95 °C	15 s	
60 °C	60 s	

Nach jedem Lauf wurde zur Überprüfung der PCR-Produkte eine Schmelzkurve erstellt und die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Die Auswertung erfolgte durch die $2^{-\Delta Ct}$ -Methode mit dem Gen für das ribosomale Protein S2 (RPS2) als Referenzgen. Hierfür wurde für jede Reaktion ein Ct-Wert ermittelt. Dieser entspricht dem Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal einen Schwellenwert überschreitet. Der Schwellenwert wurde jeweils für ein Gen bestimmt. Für die Auswertung mithilfe der $2^{-\Delta Ct}$ -Methode wurde die Differenz aus den Ct-Werten des Referenzgens und der Zielgene gebildet.

4.1.15 Herstellung der Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonden

Mit Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonden, die komplementär zu einer Ziel-RNA sind, kann diese mittels Northern Blot-Analysen oder *in situ* Hybridisierungen

nachgewiesen werden. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden DIG-markierte RNA-Sonden verwendet, die komplementär zu einem Teil der murinen Carnosin-Synthase sind und die wie folgt hergestellt wurden. Zunächst wurde ein Vektor kloniert (pBSK-Carns1-Ex4-8-rev; Oligonukleotide #1+2 an pEGFP-Carns1 in pBSK), der einen Teil der cDNA der murinen Carnosin-Synthase (424-1254bp von 3968bp) enthält. Dieser wurde anschließend durch geeignete Restriktionsendonukleasen geschnitten, sodass DNA-Fragmente entstehen, die jeweils von den Promotoren aus (T3 und T7) hinter der Carns1-cDNA abbrechen. Die linearisierte DNA wurde über ein Agarosegel gereinigt und anschließend einer Phenol/Chloroform-Fällung unterzogen. Die *in vitro* Transkription mit T3 bzw. T7 RNA-Polymerase und entsprechenden DIG-markierten Nukleotiden wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch die *in vitro* Transkription mit der T7 RNA-Polymerase entsteht eine Antisense-Sonde, die komplementär zur Ziel-mRNA ist, wohingegen durch die *in vitro* Transkription mit der T3 RNA-Polymerase eine Sense-Sonde entsteht, die der Ziel-mRNA entspricht und als Kontrolle eingesetzt werden kann. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen:

Komponente	Menge
DNA (~50 ng/µl)	14 µl
10x <i>DIG RNA labeling Mix</i>	2 µl
<i>T3 bzw. T7 RNA-Polymerase</i>	2 µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl

Nach 4 h Inkubation bei 37 °C wurden 2 µl DNase I (10 U/µl; RNase-frei) dem Reaktionsansatz zugegeben und weitere 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,2 M, pH 8) gestoppt. Durch die Zugabe von 2,4 µl Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und 48 µl Ethanol (100 % (v/v)) und der Inkubation für 1 h bei -80 °C wurde die RNA gefällt. Nach Zentrifugation (18.000 g; 30 min; 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl Ethanol (100 % (v/v); -20 °C) gewaschen. Die Probe wurde erneut zentrifugiert (18.000 g; 15 min; 4 °C), der Überstand verworfen und das getrocknete Pellet in 50 µl dH₂O gelöst.

4.1.16 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Gelelektrophorese beruht auf der Methode der Agarose-Gelelektrophorese (vergleiche Abschnitt 4.1.3), wobei das Agarosegel (1 % (w/v)) hier mit einem anderem Puffer hergestellt wurde (1x RNA-Laufpuffer + 0,65 % (v/v) Formaldehyd) und kein Ethidiumbromid enthält. Die RNA-Proben wurden mit ethidiumbromidhaltigem Ladepuffer (2x RNA Gel Loading Dye, Fermentas) versetzt. Die Größenauftrennung erfolgte in einer mit 1x RNA-Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer bei 100 V für ~2 h. Unter UV-Licht (260 nm) konnte anschließend die RNA sichtbar gemacht werden.

4.1.17 RNA-Transfer mittels Northern Blot

Der Northern Blot ist eine Methode, bei der RNA, die zuvor mittels RNA-Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, auf eine Membran übertragen wird. Anschließend können spezifische RNA-Sequenzen mit RNA-Sonden nachgewiesen werden. In den hier durchgeführten Northern Blot-Analysen wurden DIG-markierte RNA-Sonden verwendet (vergleiche Abschnitt 4.1.15).

Das RNA-Gel (vergleiche Abschnitt 4.1.16) wurde hierfür zunächst kurz in dH₂O gewaschen und dann dreimal für 20 min in 20x Natriumcitrat-Puffer (SSC) equilibriert, bevor der Kapillar-Blot zusammen gebaut wurde. Die treibende Kraft ist der 20x SSC-Puffer, der durch Kapillarkräfte durch das RNA-Gel und die darüber liegende Nylonmembran gesogen wird. Auf der Membran liegen einige Lagen saugfähigen Papiers, um die Kapillarkräfte über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten. Die negativ geladene RNA wird dabei aus dem Agarosegel auf die positivgeladene Nylonmembran (Amersham Hybond N+, GE Healthcare) übertragen. Nach ~20 h wurde die Membran von beiden Seiten kurz mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, bevor sie in Hybridisierungslösung (*DIG Easy Hyb*, Roche Diagnostics) für ~1 h bei 68 °C prähybridisiert wurde. Die DIG-RNA-Sonden wurden zunächst für 10 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Für die Hybridisierung der RNA mit den DIG-RNA-Sonden wurden die Sonden in vorgewärmter Hybridisierungslösung (68 °C) verdünnt (400 ng/ml) und die

Membran darin bei 68 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 15 min (2x SSC-Puffer + 0,1 % (w/v) SDS) und dreimal für 20 min (0,1x SSC-Puffer + 0,1 % (w/v) SDS; 68 °C) gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran zunächst kurz in Waschlösung equilibriert (Maleinsäurepuffer + 0,3 % (v/v) Tween 20), für 30 min in Blockier-Reagenz (Maleinsäurepuffer + 1 % (w/v) *Blocking Reagent*, Roche) und dann für 30 min in Antikörper-Lösung (alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Digoxigenin-Antikörper, Roche; 1:10.000 in Blockier-Reagenz) inkubiert, bevor sie fünfmal in Waschlösung (Maleinsäurepuffer + 0,3 % (v/v) Tween 20) gewaschen wurde. Nach der Equilibrierung der Membran in Entwicklungspuffer erfolgte die Entwicklung des Signals durch die Inkubation der Membran für 5 min in CSPD (Roche; 1:100 in Entwicklungspuffer). Um die Signalentwicklung zu verstärken, wurde die Membran in Folie eingeschweißt und für 45 min bei 37 °C inkubiert.

4.2 Arbeiten mit Proteinen und Peptiden

4.2.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Herstellerangaben mithilfe des DCTM Protein Assays (BIO-RAD) durchgeführt, der auf der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951) beruht. Die Konzentration der Probe wurde mit einer Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) ermittelt, die im selben Puffer wie die Probe angesetzt wurde (0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml). Die Reaktionen wurden in Triplikaten durchgeführt und liefen in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96-well) ab. Die Absorption wurde anschließend mit einem Mikrotiterplatten-Messgerät (GENios, Tecan) bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen.

4.2.2 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, mit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können (Laemmli,

1970). Das hier verwendete diskontinuierliche SDS-Gel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel und wurde wie folgt jeweils frisch angesetzt.

Komponente	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (7,5 %)
Acrylamid	5 % (v/v)	10 % (v/v)	7,5 % (v/v)
Tris-HCl pH 6,8	0,125 M		
Tris-HCl pH 8,8		0,375 M	0,75 M
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
APS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Wenn nichts anderes angegeben ist, handelte es sich hier um SDS-Gele mit einem 10 %igen Trenngel. Die Auftrennung der Proteine erfolgte neben einem Größenstandard in einer mit SDS-Laufpuffer (1x) gefüllten vertikalen Gelelektrophoresekammer bei ~80-200 V.

4.2.3 Protein-Transfer mittels Western Blot (*semi-dry*)

Bei der Western Blot-Methode werden die zuvor in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Acrylamidgel auf eine Membran übertragen. Das Gel liegt dabei auf einer Membran, wobei unter der Membran und über dem Gel in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere liegen. Die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde zuvor in Methanol (100 % (v/v)) aktiviert. Der Transfer der Proteine erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel bzw. zur Membran. Bei den hier durchgeführten Western Blot-Analysen wurde eine konstante Stromstärke von 1 mA pro cm² der Membran über einen Zeitraum von 90 min angelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch Färbung mit Coomassie-Lösung und Entfärbung mit Coomassie-Entfärber-Lösung überprüft. Die Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgte durch Inkubation der Membran für ≥ 60 min in 5 % (w/v) Magermilchpulver in

TBS-T und die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper in 0,5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen, bevor sie mit dem Sekundärantikörper in 0,5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal in TBS-T gewaschen. Die Visualisierung der Signale erfolgte mittels verstärkter Chemilumineszenz (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Fischer Scientific) nach Herstellerangaben.

4.2.4 Coomassiefärbung von SDS-Gelen und PVDF-Membranen

Proteine können mithilfe eines Triphenylmethanfarbstoffes (Coomassie-Brilliant-Blau) angefärbt und somit in einem SDS-Gel oder auf einer PVDF-Membran sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde die PVDF-Membran nach dem Proteintransfer kurz in Coomassie-Lösung inkubiert, mehrfach mit Coomassie-Entfärbelösung gewaschen und anschließend getrocknet. Für die Färbung des SDS-Gels wurde es nach der gelelektrophoretischen Auftrennung für 20 min in dH₂O gewaschen und über Nacht bei RT in kolloidaler Coomassie-Lösung inkubiert. Zur Entfärbung wurde das Gel anschließend mehrfach mit dH₂O gewaschen.

4.2.5 Herstellung von Gewebehomogenaten

Die Mäuse wurden betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Für die Herstellung der Gewebehomogenate wurde das Gewebe direkt nach Entnahme aus dem Tier auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Gewebe in 0,25 – 1 ml kaltem Homogenisierungspuffer kurz aufgetaut und dreimal 20 s mit einem Dispergiergerät homogenisiert. Nach Zentrifugation (20.000 g; 30 min; 4 °C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Nach Möglichkeit wurden die Homogenate direkt für die weitere Analyse verwendet oder bei -20 °C gelagert.

4.2.6 Herstellung von Peptidextrakten

Nach Tötung der betäubten Mäuse durch zervikale Dislokation wurden die Gewebe entnommen und direkt auf Trockeneis eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei -80 °C gelagert. Nach dem Wiegen der Gewebe im gefrorenen Zustand, wurden sie in 200 – 500 µl kaltem Methanol (90 % (v/v)) kurz aufgetaut und mit einem Dispergiergerät dreimal 20 s homogenisiert. Nach Zentrifugation (10.000 g; 10 min; 4 °C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei 45 °C in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 2 µl dH₂O pro mg Feuchtgewicht des Gewebes aufgenommen und gut gemischt. Nach einer zweistündigen Behandlung in einem mit Eiswasser gefüllten Ultraschallbad wurden die Proben zentrifugiert (20.000 g; 10 min; 4 °C) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

4.2.7 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist eine Methode zur Trennung von Molekülen nach ihren physikochemischen Eigenschaften. Die hier durchgeführten Dünnschichtchromatographien wurden durchgeführt, um Peptide aus komplexen Peptidextrakten aufzutrennen. Die Peptidextrakte (vergleiche Abschnitt 4.2.6) und ggf. Standardpeptide wurden mithilfe eines Dünnschichtplatten-Auftragsgerätes auf eine 10 cm x 20 cm Kieselgel 60-Dünnschichtchromatographieplatte (HPTLC, Merck) aufgesprüht (10 nl/s) und anschließend in einer mit Laufmittel (Butanol / Essigsäure / dH₂O; 50 / 25 / 25 (v/v/v)) gesättigten Kammer chromatographisch getrennt. Nachdem die Dünnschichtplatte außerhalb der Laufkammer vollständig abgetrocknet war, wurde sie mit Ninhydrin-Lösung (0,2 % (w/v) in Ethanol) sättigend besprüht, mit heißer Luft getrocknet und für 2 min bei 180 °C inkubiert. Die DC-Platte wurde direkt nach dem Abkühlen eingescannt. Die densitometrische Quantifizierung erfolgte mithilfe der Software *AIDA Image Analyzer*. Um die densitometrische Quantifizierung zu erleichtern wurde das Bild der DC digital auf seine Blau- und Cyantöne reduziert.

4.3 Herstellung und Färbung von Gewebeschnitten

4.3.1 Perfusion von Mäusen

Durch eine intraperitoneale Injektion von 0,8 ml Tribromethanol (25 mg/ml) wurde die Maus zunächst betäubt. Nach Überprüfung ihrer Schmerzempfindlichkeit wurde sie an den Extremitäten fixiert und ihr Brustkorb entlang des Sternums geöffnet. Das Herz wurde freigelegt und der rechte Vorhof punktiert. Eine Kanüle (21 G) wurde in den linken Ventrikel gestochen und mithilfe einer Peristaltikpumpe zunächst ~30 ml Procainhydrochlorid-Lösung (1 % (w/v) in PBS) und dann ~30 ml Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS) zugeführt (~5 ml/min). Anschließend wurde der Kopf vom Körper getrennt, von überschüssigem Gewebe wie Haut und Muskeln befreit und der Schädel über Nacht bei 4 °C in PFA-Lösung inkubiert.

4.3.2 Dekalzifizierung

Der PFA-fixierte Schädel der perfundierten Maus wurde für mehrere Tage in 6 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) bei 4 °C dekalzifiziert, um anschließend bei der Herstellung der Gewebeschnitte den Knochen schneiden zu können. Jeden zweiten Tag wurde die Trichloressigsäurelösung gewechselt und der Kalziumgehalt der alten Lösung analysiert. Hierfür wurden 5 ml der verwendeten TCA-Lösung mit 1 ml Ammoniumcarbonat-Lösung (5 % (w/v)) gemischt und für ~5 min bei RT ruhig inkubiert. Fällt bei dem Gemisch Kalziumoxalat als weißer Niederschlag aus, wird das Gewebe in frische TCA-Lösung gegeben und der Kalziumtest nach zwei Tagen wiederholt. Bleibt das Gemisch klar, wurde das Kalzium vollständig aus dem Gewebe gelöst und die TCA-Behandlung kann beendet werden. Die Dekalzifizierung war in der Regel nach acht Tagen abgeschlossen und das Gewebe wurde in PBS gewaschen.

4.3.3 Gefrierschnitte

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde das fixierte und im Falle der Nasenhöhle auch dekalzifizierte Gewebe für eine Nacht bei 4 °C in 20 % (w/v) Saccharose in PBS und anschließend für eine Nacht in 30 % (w/v) Saccharose in PBS inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in Einbettmedium (Tissue Tek® O.T.C., Sakura Finetek) bei -80 °C eingefroren. Die 10 µm dicken Gefrierschnitte wurden mithilfe eines Kryostaten hergestellt, auf Adhäsions-Objektträger (SuperForst® Plus, Menzel Gläser, Thermo Scientific) aufgezogen, kurz bei RT getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.3.4 Paraffinschnitte

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurde das fixierte und dekalzifizierte Gewebe zunächst mithilfe einer Paraffiniermaschine dehydriert und paraffiniert. Anschließend wurden 4 µm dicke Gewebeschnitte an einem Mikrotom hergestellt, auf Adhäsions-Objektträger (SuperForst® Plus, Menzel Gläser, Thermo Scientific) aufgezogen und bei RT getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei RT gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung für Immun- oder Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert. Hierfür wurden diese zunächst zweimal 10 min in Xylol inkubiert und anschließend durch Inkubation (5-10 min) in absteigend konzentrierten Ethanol-Lösungen (100 %, 96 %, 70 %, 0 % (v/v)) rehydriert.

4.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient der Unterscheidung von verschiedenen Strukturen im Gewebeschnitt. Hämatoxylin färbt dabei die Zellkerne blau, während Eosin hauptsächlich das Zytoplasma rot anfärbt. Nach der Entparaffinierung der Gewebeschnitte wurden sie hierfür ~1 min in Hämalun-Lösung gefärbt und anschließend in warmen Leitungswasser gebläut. Die Färbung in Eosin-Lösung erfolgte für ~30 s, bevor die Schnitte durch Inkubation (1-3 min) in ansteigend

konzentrierten Ethanol-Lösungen (0 %, 70 %, 96 %, 100 % (v/v)) wieder dehydriert wurden. Abschließend wurden die Schnitte zweimal für 10 min in Xylol inkubiert und mit Eindeckmedium (DPX, Sigma-Aldrich) unter Deckgläsern fixiert.

4.3.6 Immunfluoreszenzfärbung

Durch die Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten können Proteine mithilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden. Für die hier durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen wurden Gefrierschnitte (vergleiche Abschnitt 4.3.3) verwendet. Die Schnitte wurden kurz bei RT aufgetaut und für 10 min in TBS gewaschen, bevor sie für 90 min in Blockierlösung (2 % BSA (w/v), 5 % (v/v) Ziegen Serum (NGS; engl.: *normal goat serum*), 0,4 % (v/v) Triton X-100 in TBS) bei RT inkubiert wurden. Die Primärantikörperbindung erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer, wobei die Primärantikörper in Blockierlösung verdünnt wurden. Im Falle der Antikörperkontrollen wurde dieser Schritt ausgelassen und die Schnitte nur mit Blockierlösung behandelt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 10 min in TBS gewaschen und für 60 min bei RT in einer dunklen, feuchten Kammer mit Sekundärantikörperlösung behandelt. Diese enthielt die entsprechenden Sekundärantikörper und das Kernfärbungsreagenz 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; 1:25.000). Nach dreimaligen Waschen für jeweils 10 min mit TBS wurden die Schnitte in dH₂O gewaschen, kurz getrocknet und mit ProLong® Gold oder ProLong® Diamond (*molecular probes*[™]) unter Deckgläsern fixiert. Nach Trocknung bei RT über Nacht im Dunkeln wurden die Schnitte bis zur mikroskopischen Analyse bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

4.3.7 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ist eine Methode zur Detektion spezifischer mRNA in Gewebeschnitten. Hierfür sind RNA-Sonden erforderlich, die spezifisch für die Ziel-mRNA sind. Die Arbeiten wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden durch dreimalige Inkubation für 10 min

in Xylol entparaffiniert, bevor sie in absteigend konzentrierten Propanol-Lösungen (100 %, 100 %, 100 %, 96 %, 90 %, 75 %, 50 % (v/v)) für jeweils 5 min inkubiert wurden. Nach 5 min Inkubation in PBS wurden die Schnitte für 90 min in 4 % (w/v) PFA fixiert und anschließend zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Es folgte ein Proteinase K-Verdau (10 µg/ml in PBS) für 4 min bei RT und zweimaliges Waschen für je 5 min in PBS. Nach anschließender Inkubation für 4 min in PBS mit 0,25 % (v/v) Triton X-100 wurden die Schnitte dreimal für 5 min in PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden nun für 8 min in Salzsäure (0,2 M), für 10 min in 0,1 M Triethanolamin mit 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid und für 10 min in 50 °C warmen 2x SSC-Puffer inkubiert. Die DIG-markierten RNA-Sonden wurden entsprechend ihrer Markierungssignalstärke (1:1.000) in Hybridisierungslösung mit 0,08 M DTT verdünnt, für 5 min bei 80 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und auf die Schnitte gegeben. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 70 °C. Die Schnitte wurden anschließend zweimal in 60 °C warmen 2x SSC-Puffer gewaschen, einmal für 5 min und einmal für 30 min. Es folgte eine Inkubation für 20 min in einem Formamid-1x SSC-Puffer-Gemisch (1:1) und für 45 min in 70 °C warmen 0,1x SSC-Puffer. Anschließend wurden die Schnitte zunächst für 5 min in MAB-Puffer equilibriert, bevor durch die 60 minütige Inkubation in Blockier-Reagenz (Maleinsäurepuffer + 2 % (w/v) *Blocking Reagent*, Roche) bei RT die unspezifischen Bindungsstellen blockiert wurden. Die Detektion der DIG-markierten RNA-Sonden erfolgte durch die Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C in Antikörperlösung (alkalische Phosphatase gekoppelter anti-Digoxidenin-Antikörper, Roche; 1:5.000 in Blockier-Reagenz). Nach anschließendem fünfmaligen Waschen für jeweils 60 min in Maleinsäurepuffer wurden die Schnitte für 5 min in Entwicklungspuffer equilibriert und abschließend die Signale durch Inkubation in NBT/BCIP-Lösung (Roche; 2 % (v/v) in Entwicklungspuffer; Endkonzentration: 0,375 mg/ml NBT bzw. 0,188 mg/ml BCIP) im Dunkeln entwickelt. Diese Lösung enthielt außerdem 2 mM Levamisol, um endogene Phosphatasen zu inhibieren und wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Nach sieben Tagen hatten sich die Signale gut sichtbar entwickelt, die Schnitte wurden für 30 min in dH₂O gewaschen und mit Kaisers Glyceringelatine unter Deckgläsern fixiert.

4.4 Arbeiten mit Zellen

4.4.1 Kultivieren von Zellen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an Werkbänken mit *Laminar-Air-Flow*-Technik und unter Verwendung von hitzesterilisierten Materialien durchgeführt. Die Kultivierung der adhärenenten Insektenzellen erfolgte in Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 28 °C. Für die Suspensionskulturen wurden die Insektenzellen in Kolben mit einem Filter für Gasaustausch in einem Schüttelinkubator bei 28 °C und 120 Umdrehungen pro Minute (Upm) inkubiert.

4.4.2 Passagieren von Zellen

Für das Passagieren von adhärenenten Insektenzellen wurde zunächst das alte Medium abgenommen und die Zellen in frischem Medium abgeschlagen (*High Five*) oder mit einem Zellschaber abgelöst (Sf-9). Anschließend wurde die Lebendzellzahl durch Trypanblau-Färbung mithilfe einer Neubaur-Zählkammer bestimmt und entsprechend verdünnt. Adhärenente Sf-9- und *High Five*-Zellen wurden in Zelldichten von $1 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^5$ Zellen pro cm^2 kultiviert. Bei *High Five*-Suspensionskulturen wurde ohne Mediumwechsel oder Zentrifugation direkt die Lebendzellzahl bestimmt und die Zellen entsprechend mit frischem Medium verdünnt. Die Suspensionszellen wurden in Zelldichten von $0,5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen pro ml kultiviert.

4.4.3 Auftauen von Zellen

Das Kryogefäß mit den Zellen ($1 \cdot 10^7$) wurde aus dem Stickstofftank entnommen, zügig aufgetaut und in 25 ml RT warmes Medium auf eine T175-Zellkulturflasche gegeben. Nach Inkubation für 1 h bei RT wurde das Medium abgenommen und frisches Medium zugegeben.

4.4.4 Einfrieren von Zellen

Das Medium der adhärennten Zellen wurde abgenommen und die Zellen wurden in einem kleineren Volumen Medium wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben abgelöst. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt und die Zellen auf eine Dichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml mit Medium und einer DMSO-Endkonzentration von 10 % (v/v) verdünnt. Die Zellen wurden in Kryogefäße überführt und zunächst langsam bei -80 °C eingefroren bevor sie zur Langzeitlagerung in einen Stickstofftank überführt wurden.

4.4.5 Transfektion von Sf-9-Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Die Transfektion der Sf-9-Zellen mit Bacmid-DNA wurde mithilfe des *Cellfectin*® // Transfektionsreagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bacmid-DNA enthielt zur Kontrolle ein EGFP-Gen, sodass die Effizienz der Transfektion durch das Fluoreszenzsignal überprüft werden konnte. Die Zellen wurden bei 28 °C inkubiert und die Anzahl der fluoreszierenden Zellen regelmäßig überprüft. Nach $\sim 96\text{ h}$ wurde der Sf-9-Überstand mit den Baculoviren abgenommen, zentrifugiert (500 g ; 5 min ; RT) und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

4.4.6 Titerbestimmung des Baculoviren-Stocks

Um die Infektiosität eines Baculoviren-Stocks zu bestimmen, wurde die Titerbestimmung wie von Philipps et al. (2005) beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe des Baculoviren-Stocks hergestellt, *High Five*-Zellen in einer Mikrotiterplatte infiziert und für 96 h bei 28 °C inkubiert. Nach Auszählung der Vertiefungen mit mindestens einer fluoreszierenden Zelle wurde der Titer des Baculoviren-Stocks berechnet.

4.4.7 Infektion von Sf-9-Zellen

Zur Vermehrung der Baculoviren nach Transfektion wurden $1 \cdot 10^5$ Sf-9-Zellen pro cm^2 mit einer Infektionsvielfachheit (MOI; engl.: *multiplicity of infection*) von 0,001-0,1 infiziert. Nach ~96 h wurde der Sf-9-Überstand mit den Baculoviren abgenommen, zentrifugiert (500 g; 5 min; RT), der Titer bestimmt und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

4.4.8 Infektion von High Five-Zellen

Um adhärenente *High Five*-Zellen zu infizieren wurden Baculoviren aus dem Sf-9-Überstand auf $1 \cdot 10^5$ Zellen pro cm^2 gegeben und bei 28 °C inkubiert. Um große Mengen rekombinantes Protein zu erhalten wurden *High Five*-Zellen in Suspension kultiviert und bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml durch Zugabe der entsprechenden Menge des Baculoviren-Stocks infiziert.

4.5 Carnosin-Synthase Produktion und Reinigung

4.5.1 Produktion von HST-Carns1 mithilfe des Baculovirus-Systems

Zur rekombinanten Produktion der murinen Carnosin-Synthase wurde zunächst ein Baculovirus-Expressionsvektor (pUltraBac-HST-Carns1) kloniert, der für die Carnosin-Synthase mit N-terminalen HST-Tag kodiert. Dieser besteht aus einem 6xHis-Tag, einem Twin-Strep-Tag® und einer TEV-Protease-Schnittstelle. Der Vektor wurde in *E.coli* DH10Bac transformiert und die rekombinante Bacmid-DNA isoliert. Diese wurde anschließend in Sf-9-Zellen transfiziert, um Baculoviren zu erhalten. Nach Vermehrung der Baculoviren durch Infektion von Sf-9-Zellen und anschließender Titerbestimmung wurden zunächst sechs kleinere *High Five*-Suspensionskulturen (50 ml) infiziert, um die Produktion der rekombinanten Carnosin-Synthase zu optimieren. Für die Reinigung der murinen Carnosin-Synthase wurden anschließend vier größere *High Five*-Suspensionskulturen (500 ml) angesetzt und mit einer MOI von 20 aus dem entsprechenden

Baculovirus-Stock infiziert. Die Zellen wurden nach ~96 h zentrifugiert (500 g; 10 min; RT) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.5.2 Herstellung des *High Five*-Zelllysates

Das Zellpellet der zuvor infizierten *High Five*-Zellen wurde in 1 ml Lysepuffer pro 10 ml Suspensionskultur auf Eis aufgetaut, resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert, dabei wurde der Ansatz alle 10 min kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen mechanisch zerstört, indem sie dreimal durch eine G20-Kanüle und einmal durch eine G25-Kanüle gezogen wurden. Nach dreimaliger Zentrifugation (18.000 g; 15 min; 4°C) wurde der Überstand filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm).

4.5.3 Affinitätsreinigung der HST-Carns1

Die Affinitätsreinigung erfolgte unter Verwendung einer 5 ml *HisPur™ Cobalt Chromatography Cartridge* (Thermo Fischer Scientific) und einer Äkta-FPLC-Anlage bei 4 °C. Während des gesamten Reinigungsvorgangs wurde die Absorption bei 280 nm detektiert. Alle Puffer wurden vor Verwendung filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm). Das Lysat wurde im Verhältnis 1:1 mit Equilibrierungspuffer gemischt und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min auf die zuvor equilibrierte Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit ~50 ml Equilibrierungspuffer gewaschen und das rekombinante Protein mit mindestens 25 ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde dabei in 2 ml-Fraktionen aufgefangen. Eluatfraktionen, die HST-Carns1 enthielten (mindestens 300 m-AU) wurden vereint und dialysiert. Die Dialyse (Molekulargewicht-Ausschlussgrenze: 12-14 kDa) erfolgte dabei zweimal für etwa 8 h bei 4 °C gegen Dialysepuffer. Die Reinheit des rekombinanten Proteins wurde im SDS-Gel und mittels Größenausschlusschromatographie überprüft und der Proteingehalt bestimmt.

4.5.4 TEV-Proteaseverdau

Proteasen sind Enzyme, die Proteine oder Peptide spalten können. Spezifische Proteasen, die Peptidbindung nur bei einer bestimmten Aminosäuresequenz spalten, können als molekulares Werkzeug genutzt werden. Der N-terminal fusionierte HST-Tag der HST-Carns1 enthält hinter dem 6xHis-Tag und dem Twin-Strep-Tag® auch eine TEV-Protease-Schnittstelle. Um den Tag der rekombinanten Carnosin-Synthase abzuspalten, wurde die zuvor gereinigte HST-Carns1 (~30 mg) mit TEV-Protease (~800 µg) versetzt und für 4 h bei 8 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz im Verhältnis 1:1 mit Equilibrierungspuffer versetzt und erneut mithilfe einer Äkta-FPLC-Anlage bei 4 °C über eine zuvor equilibrierte *HisPur™ Cobalt Chromatography Cartridge* (Thermo Fischer Scientific) gegeben. Da die rekombinante TEV-Protease ebenfalls einen His-Tag besitzt, bindet sowohl diese als auch der abgespaltene His-Strep-Tag an das Säulenmaterial und die Carnosin-Synthase kann im Durchbruch aufgefangen werden. Der Durchbruch wurde abschließend zweimal für etwa 8 h gegen Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert und die Abspaltung des Tags mittels Western Blot-Analyse überprüft.

4.5.5 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie werden Moleküle entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Kleine Moleküle dringen dabei tiefer in das poröse Material der stationären Phase ein als große, wodurch die Retentionszeit der kleinen Moleküle verlängert wird und sie somit später eluiert werden. Mit dieser Methode kann sowohl die Reinheit einer Proteinlösung überprüft werden als auch das Molekulargewicht mithilfe von Standardproteinen analysiert werden. Die hier durchgeführte Größenausschlusschromatographie wurde mithilfe einer ÄKTA-FPLC-Anlage unter Verwendung einer Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences) durchgeführt. Als mobile Phase wurde Dialysepuffer verwendet und bei 4 °C mit 0,2 ml/min über die Säule gepumpt. Für die Analyse wurden ~285 µg gereinigte HST-Carns1 aufgetragen und die Absorption bei 280 nm detektiert. In einem zweiten Lauf wurde ein Proteinstandard aufgetragen (Thyreoglobulin:

669 kDa, Ferritin: 440 kDa, Aldolase: 158 kDa und Ovalbumin: 43 kDa) und durch die Überlagerung der Absorptionssignale das Molekulargewicht der HST-Carns1 ermittelt.

4.5.6 Nicht-radioaktive Enzymaktivitätsbestimmung

Für die hier durchgeführten Enzymaktivitätsbestimmungen wurde direkt die aus Insektenzellen gereinigte HST-Carns1 oder die bereits proteolytisch behandelte rekombinante Carnosin-Synthase ohne *Tag* verwendet. Die Methode zur Aktivitätsbestimmung der Carnosin-Synthase beruht auf einer gekoppelten Reaktion. Bei der Synthese von Carnosin durch die Carnosin-Synthase wird ATP zu ADP und P_i hydrolysiert. Das freigesetzte P_i und 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin-Ribonukleosid (MESG) sind die beiden Substrate der Purinnukleosidphosphorylase (PNP). Bei dieser gekoppelten Reaktion wird 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin und Ribose-1-Phosphat gebildet, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 330 nm zu 360 nm führt. Die Änderung der Absorption bei 360 nm wurde hier zur Detektion genutzt. Die Enzymreaktionen liefen in einem Endvolumen von 50 μ l in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (384-well) ab, wobei zunächst die Carnosin-Synthase (0,3 μ g) vorgelegt wurde und dann die Reaktion durch Zugabe des restlichen, vorinkubierten (15 min; RT) Reaktionsansatzes gestartet wurde.

Komponente	Menge
PNP-Reaktionspuffer (20x)	2 μ l
MESG (1 mM)	10 μ l
PNP (100 U/ml)	0,5 μ l
Carns1-Substrat Mix: 50 mM ATP 50 mM β -Alanin 50 mM L-Histidin 50 mM und $MgCl_2$	5 μ l
dH ₂ O	22,5 μ l
Carnosin-Synthase (0,3 μ g) in 1x PNP-Reaktionspuffer	10 μ l

Die Platte wurde kurz zentrifugiert (1.000 g; 15 s; RT) und die Absorption bei 360 nm bei RT in einem Mikrotiterplatten-Messgerät (Infinite Pro 200, Tecan) über einen Zeitraum von 2 h detektiert. Für Reaktionen mit Phosphatstandard wurden verschiedene Mengen einer definierten Phosphatlösung anstelle der Carnosin-Synthase eingesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Expression der Carnosin-Synthase im Mausgewebe

Um die murine Carnosin-Synthase zu charakterisieren, wurde zunächst untersucht, in welchen Mausgeweben das Enzym vorkommt und ob dies mit der Lokalisation der entsprechenden mRNA und des Dipeptids Carnosin übereinstimmt. Hierfür wurden Wildtyp-, *Carns1-knock-out*- und *Carns1*-heterozygot-Mäuse verwendet. Zu erwähnen sei an dieser Stelle, dass bei der Entwicklung der *Carns1-knock-out*-Maus der gesamte kodierende Bereich des *Carns1*-Gens deletiert wurde. Im Weiteren wurde die Konzentration von Carnosin-Synthase und Carnosin im Riechhirn bzw. Skelettmuskel von Mäusen unterschiedlichen Alters analysiert.

5.1.1 Western Blot-Analysen

Homogenate von verschiedenen Geweben von Wildtyp- und *Carns1-knock-out*-Mäusen wurden mittels Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen die murine Carnosin-Synthase analysiert. Betrachtet wurden Riechepithel, Riechhirn, Vorderhirn, Stammhirn, Kleinhirn, Rückenmark, Skelettmuskel, Herz, Leber, Niere, Milz, Thymus und Lunge. Damit die Signal-Intensitäten miteinander verglichen werden können, wurde, abgesehen von den Riechepithel-Proben (20 µg) jeweils dieselbe Menge Gesamtprotein (100 µg) eingesetzt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 5.1 dargestellt. In der Coomassie-Färbung der PVDF-Membran in Abbildung 5.1 A ist die gleichmäßige Beladung der Spuren zu sehen. Wie Abbildung 5.1 B zeigt, beschränkt sich das Vorkommen der Carnosin-Synthase (errechnetes Molekulargewicht ~102 kDa) auf erregbares Gewebe. Die deutlichsten Signale sind in Riechepithel und Riechhirn zu sehen. Auch im Stammhirn, Kleinhirn, Rückenmark, Skelettmuskel und Herz konnte das Enzym detektiert werden. Nicht detektierbar war das Enzym hingegen in Vorderhirn, Leber, Niere, Milz, Thymus und Lunge. Um zu zeigen, dass es sich dabei um ein spezifisches Signal handelt, wurden die Wildtyp- und *Carns1-knock-out*-Proben

jeweils nebeneinander aufgetragen. In keinem der Carnosin-*knock-out*-Gewebe konnte die Carnosin-Synthase nachgewiesen werden. In Riechepithel und Riechhirn des Wildtyp-Tieres konnte die größte Menge des Enzyms detektiert werden. Da das Signal im Riechepithel ähnlich stark ist wie das im Riechhirn, obwohl nur 1/5 des Gesamtproteins im Vergleich zum Riechhirn aufgetragen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentration der Carnosin-Synthase im Riechepithel am Größten ist.

Bei genauer Betrachtung der Carnosin-Synthase-Signale in den verschiedenen Geweben fällt auf, dass die Signale im Riechepithel und im Skelettmuskel im Vergleich zu allen anderen Geweben etwas nach oben verschoben sind. Die kleinere Verschiebung des Carnosin-Synthase-Signals im Skelettmuskel kann dadurch erklärt werden, dass im Skelettmuskelgewebehomogenat ein sehr dominantes anderes Protein mit ähnlicher Masse zu finden ist. Dieses ist in der Coomassiefärbung deutlich zu erkennen. Es ist daher möglich, dass die Carnosin-Synthase im Gel leicht nach oben verdrängt wird, wodurch die Abweichung erklärbar ist. Der scheinbare Unterschied im Molekulargewicht der Carnosin-Synthase des Riechepithels ist ähnlich zu erklären. Durch die unterschiedliche Menge geladenen Gesamtproteins kann das Laufverhalten der Proteine beeinflusst werden.

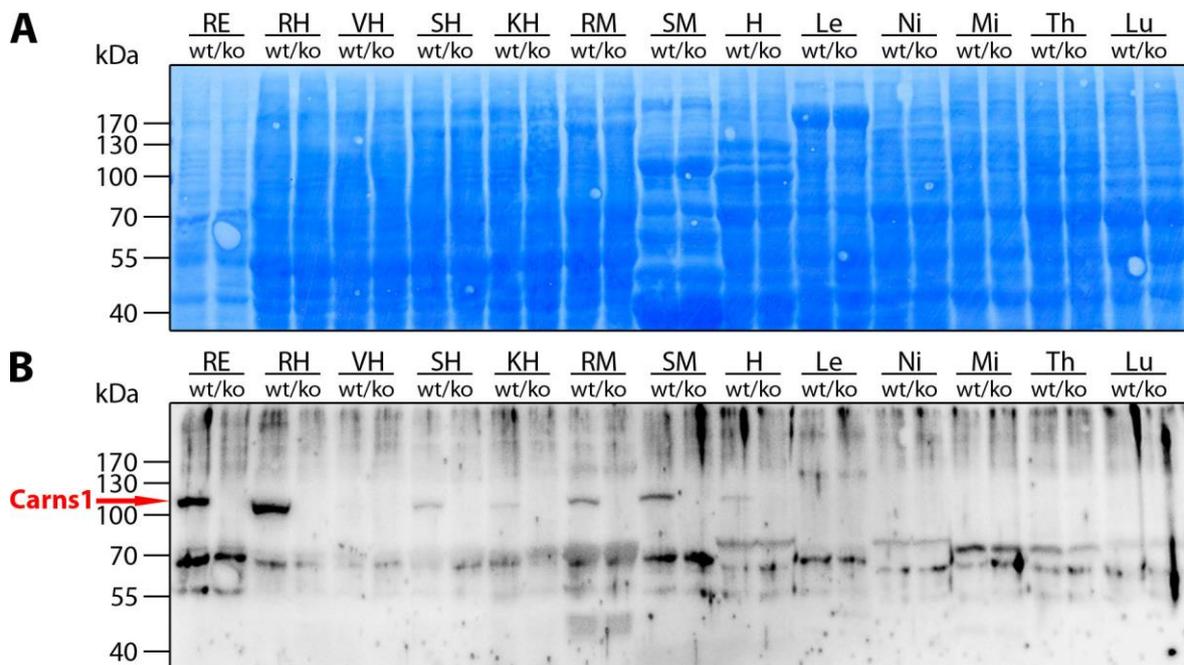


Abbildung 5.1: Western Blot-Analysen von Wildtyp- und Carns1-knock-out-Gewebehomogenaten.

Die Mausgewebe (RE Riechepithel, RH Riechhirn, VH Vorderhirn, SH Stammhirn, KH Kleinhirn, RM Rückenmark, SM Skelettmuskel, H Herz, Le Leber, Ni Niere, Mi Milz, Th Thymus, Lu Lunge) wurden homogenisiert und anschließend der Gesamtproteingehalt der Homogenate bestimmt. Je 100 µg Gesamtprotein (Ausnahme Riechepithel: 20 µg) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und anschließend im Western Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Wt = Wildtyp, ko = *Knock-out*. (A) Coomassie-gefärbte PVDF-Membran. (B) Nach vollständigem Entfärben der Membran wurde die Western Blot-Analyse fortgesetzt, wobei der verwendete Primärantikörper gegen den C-terminalen Teil der murinen Carnosin-Synthase (gp-a-mCarns1-C) gerichtet ist und als Sekundärantikörper Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Meerschweinchen-Antikörper (POX-a-gp) verwendet wurde. Zur Detektion wurde die verstärkte Chemilumineszenz (ECL) eingesetzt. Errechnetes Molekulargewicht der murinen Carnosin-Synthase ~102 kDa.

5.1.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zum besseren Verständnis der Mausanatomie der Nasenhöhle ist in Abbildung 5.2 ein Hämatoxylin-Eosin-gefärbter koronaler Paraffinschnitt der Nase dargestellt. Abbildung 5.2 A zeigt die Lage des Riechepithels in der Nasenhöhle. Unter anderem zu erkennen sind die Nasenscheidewand, das Vomeronasalorgan, Zahnwurzeln und etwas Muskulatur. Beim Vomeronasalorgan handelt es sich um einen speziellen Teil des Geruchsorgans, der hauptsächlich für die Wahrnehmung von Pheromonen zuständig ist. Der obere Teil der Nasenhöhle ist von innen mit Riechepithel ausgekleidet, das somit einen Teil der Nasenscheidewand beschichtet. Abbildung 5.2 B zeigt die Vergrößerung des Riechepithels. Beispielhaft gekennzeichnet sind Axonbündel, Blutgefäße, Knochen und

Riechepithel. Bei den Riechsinneszellen handelt es sich um primäre Rezeptorneurone, deren Zellkörper im Riechepithel liegen und deren Axone sich bündeln, durch das dünne Siebbein hindurch bis in die *Glomeruli olfactorii*-Schicht des Riechhirns reichen und erst dort Synapsen mit den Mitralzellen bilden. In Abbildung 5.2 A ist außerdem der Ausschnitt (blaues Rechteck) der in Abbildung 5.4 gezeigten Immunfärbung dargestellt.

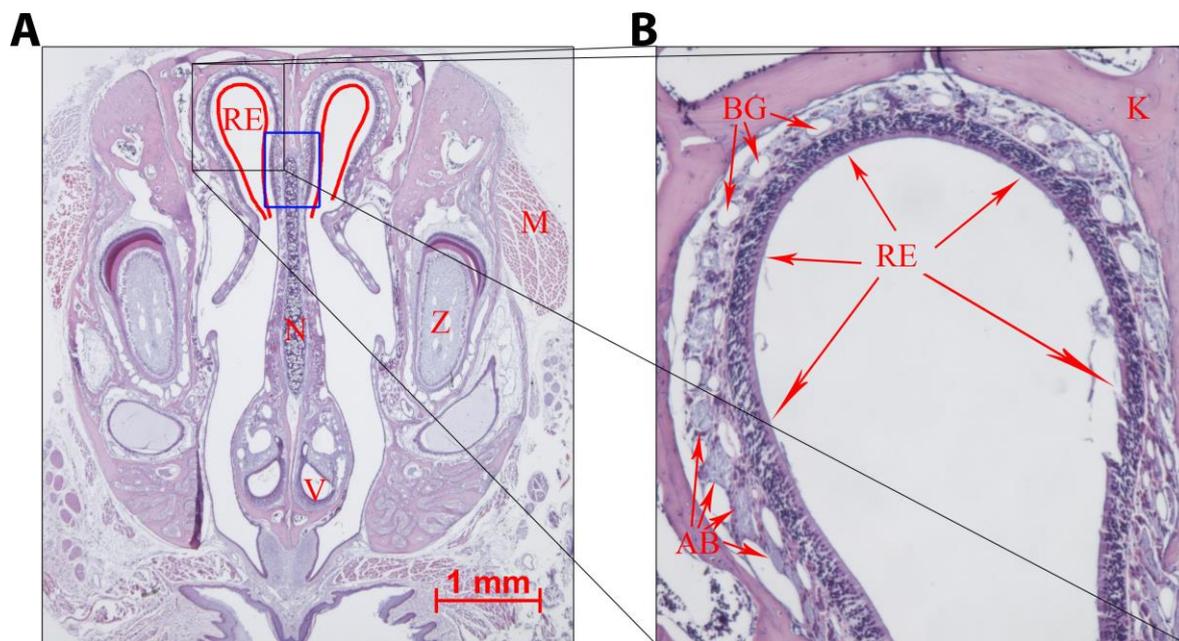


Abbildung 5.2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines koronalen Nasenschnittes.

Gefärbt wurde ein 4 µm dicker koronaler Paraffinschnitt der Nase eines dekalzifizierten Mausschädels. (A) Riechepithel (RE), Nasenscheidewand (N), Vomeronasalorgan (V), Muskulatur (M) und Zahnwurzel (Z) wurden gekennzeichnet. Das blaue Rechteck stellt den Ausschnitt der in Abbildung 5.4 gezeigten Immunfärbung des Riechepithels dar. (B) Vergrößerung des Riechepithels der linken Nasenhöhle. Beispielhaft gekennzeichnet wurden Axonbündel (AB), Blutgefäße (BG), Knochen (K) und Riechepithel (RE).

Um die zelluläre Lokalisation der Carnosin-Synthase im Riechepithel zu untersuchen, wurden koronale Gefrierschnitte von dekalzifizierten Mausschädeln hergestellt und mittels Immunfluoreszenzmarkierung analysiert (Abbildung 5.3, Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5).

Bei der konfokalen Laserscanmikroskopie wird nur eine Ebene des Präparats beleuchtet und nicht der ganze Schnitt, wie bei der konventionellen Lichtmikroskopie. Aus diesem Grund werden nur die Signale der Fokusebene

detektiert und nicht die Signale der Ebenen, die darüber und darunter liegen. Diese Technik ermöglicht auch in dickeren Gewebeschnitten die Beurteilung, ob die Signale von verschiedenen Antigenen tatsächlich kolokalisiert sind. Für die konfokalen Laserscanmikroskopie wurden die koronalen Gefrierschnitte von Mausschädeln verwendet und mit Antikörpern gegen Carnosin-Synthase und Carnosin gefärbt. Letzterer wird von der Firma Abcam (ab36953) für die Anwendung in ELISA-Analysen verkauft. Für die Verwendung des Antikörpers in immunhistochemischen Analysen gibt es bislang noch keine Daten. Mithilfe des *Carns1-knock-out*-Gewebes konnte hier die Funktionalität des Antikörpers für diese Methode gezeigt werden. In Abbildung 5.3 sind die konfokalen Laserscanmikroskopie-Aufnahmen abgebildet. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Riechepithels am äußeren Rand der Nasenhöhle. Am unteren Ende der Aufnahmen ist jeweils ein Blutgefäß zu sehen. Die Axonbündel liegen darunter und sind nicht mit abgebildet. Das Riechepithel ist aus drei Zelltypen aufgebaut, den Stützzellen, deren Zellkörper bis zur Oberfläche des Epithels reichen, den Riechsinneszellen, sowie den Basalzellen, die am unteren Ende des Epithels sitzen und aus denen sich neue Rezeptorneurone entwickeln können. Die Riechsinneszellen sind bipolare Rezeptorneurone und bilden distal zur Epitheloberfläche hin einen langen Dendriten, an dessen Ende der Riechkolben mit den Zilien sitzt. Proximal bilden sie jeweils ein langes Axon aus, die gebündelt werden und bis ins Riechhirn reichen.

Wie in den Färbungen des Wildtyp-Gewebes (Abbildung 5.3 A I-III) zu erkennen ist, sind Carnosin (rot) und die Carnosin-Synthase (grün) in denselben Zellen lokalisiert. In der Überlagerung der Signale (III) erscheinen die kolokalisierten Signale gelb. Es handelt sich dabei vermutlich um Rezeptorneurone mit den nach oben gerichteten Dendriten, die bei einigen Zellen deutlich zu erkennen sind. In den an der Oberfläche gelegenen Stützzellen des Riechepithels, die in den DAPI-Färbungen gut zu sehen sind, ist weder das Signal der Carnosin- noch das der Carnosin-Synthase-Färbung lokalisiert. Die Unterscheidung zwischen den Rezeptorneuronen, deren Dendrit nicht in der Fokusebene liegt, und den Basalzellen ist nicht auszumachen. Die Färbung gegen Carnosin, als auch die gegen die Carnosin-Synthase erscheint jedoch in den Zellen stärker, bei denen

der Dendrit deutlich zu erkennen ist. In den Färbungen der *Carns1-knock-out*-Gewebe (Abbildung 5.3 B I-III) sind wie erwartet weder Signale der Färbung gegen Carnosin noch die gegen die Carnosin-Synthase zu erkennen. Die Antikörperkontrollen (A IV-VI und B IV-VI), in denen jeweils auf den Primärantikörper verzichtet wurde, stellen die durch den Sekundärantikörper verursachte Hintergrundfärbung dar.

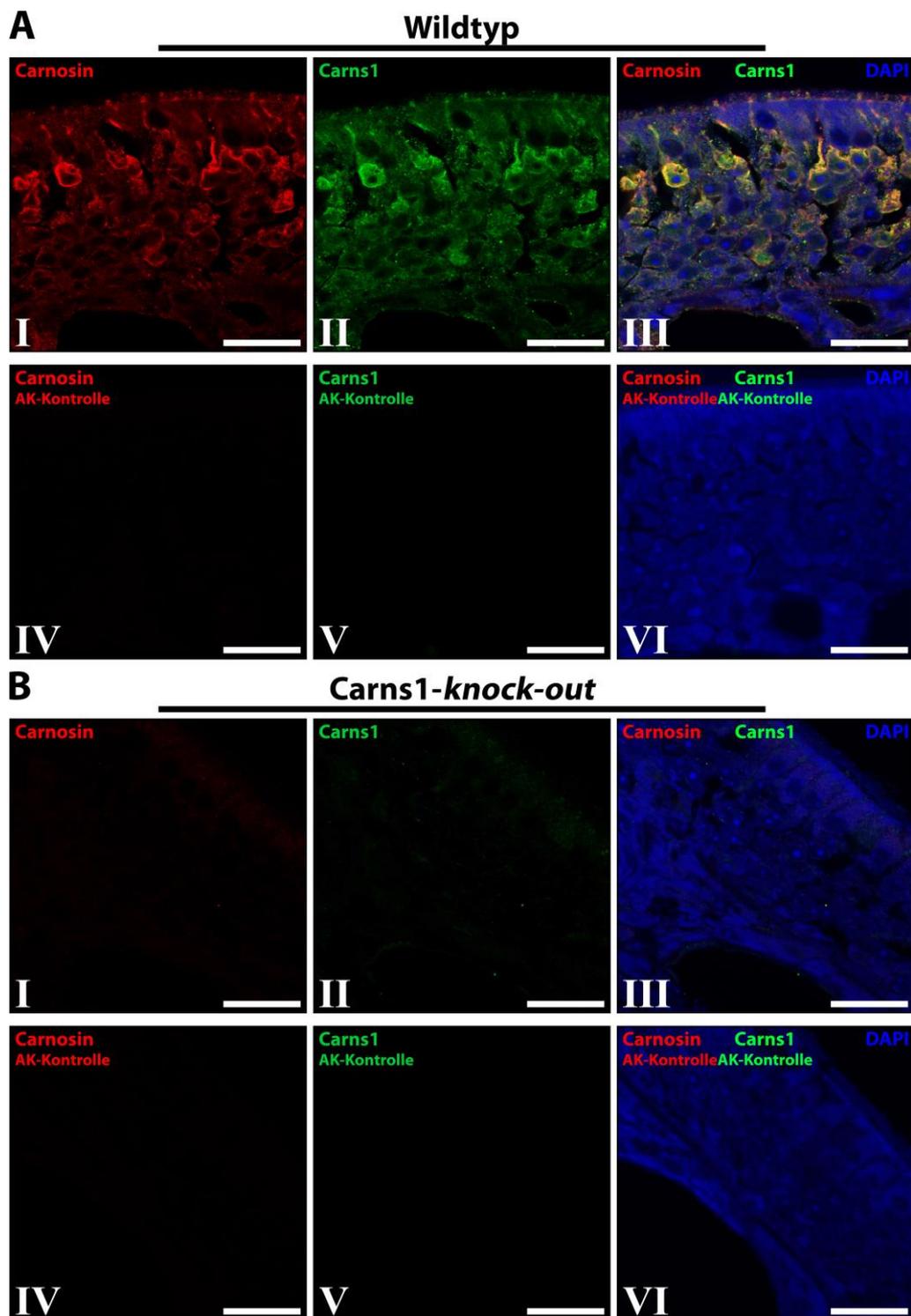


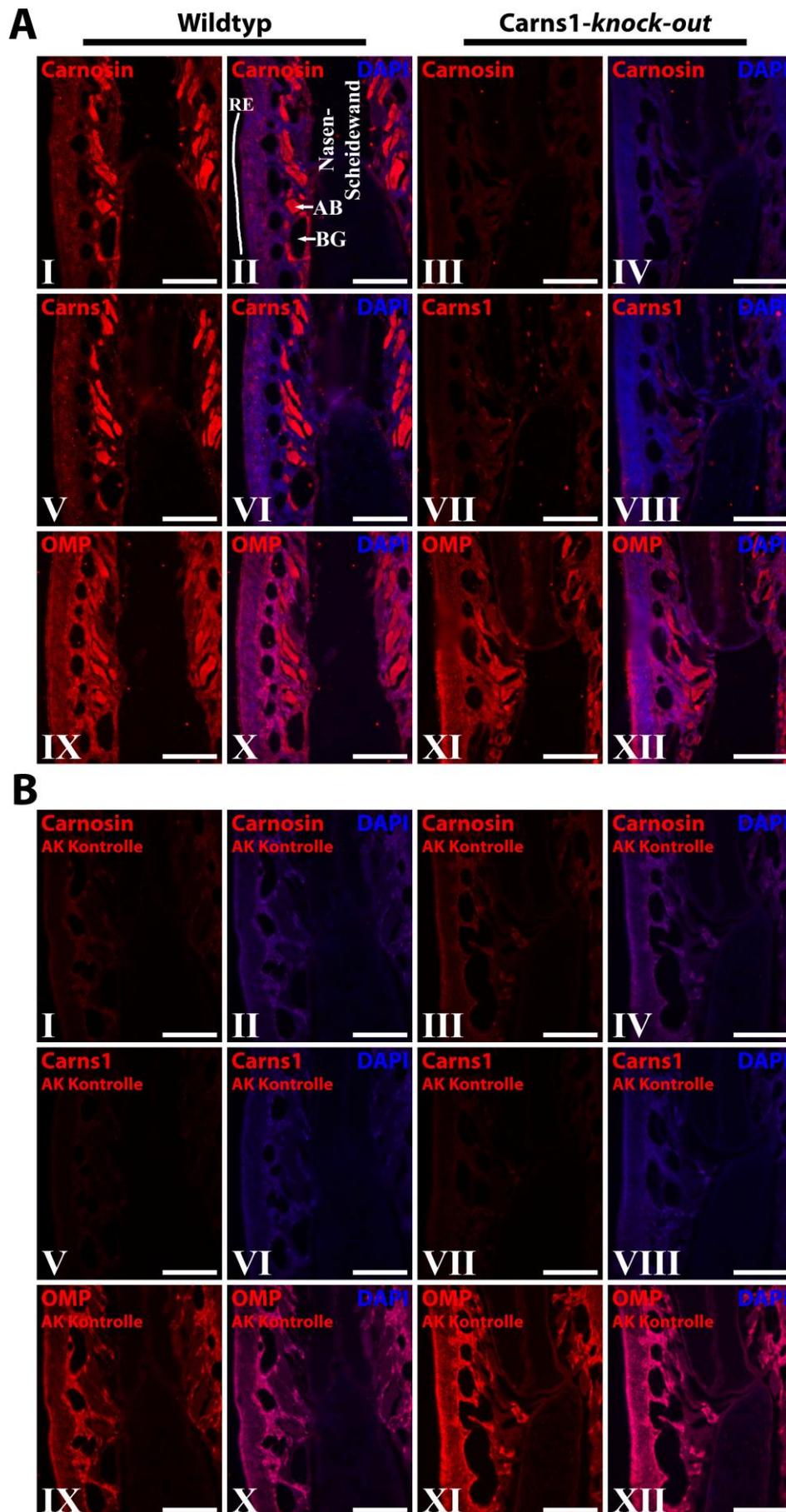
Abbildung 5.3: Konfokale Laserscanmikroskopie des Riechepithels.

Gefärbt wurden 10 µm dicke koronale Gefrierschnitte der Nase von dekalzifizierten (A) Wildtyp- und (B) Carns1-knock-out-Mausschädeln. Abgebildet ist ein Ausschnitt des Riechepithels am äußeren Rand der Nasenhöhle. Die Schnitte wurden mit Antikörper gegen Carnosin (rot; rb-a-Carnosin) und Carnosin-Synthase (Carns1) (grün; gp-a-Carns1-C) behandelt. Als Sekundäntikörper wurde Cy3 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Cy3-a-rb) bzw. Alexa-Fluor®-647 gekoppelter Ziege-anti-Meerschweinchen (Alexa647-a-gp) verwendet, die zusammen mit DAPI (blau) inkubiert wurden. In den Antikörperkontrollfärbungen (A IV-VI und B IV-VI) wurde auf die Primäntikörper verzichtet. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss LSM 800 mit Airyscan gemacht. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 µm.

Für lichtmikroskopische Aufnahmen erfolgten weitere Immunfärbungen in direkt aufeinanderfolgenden Serienschnitten mit Antikörpern gegen Carnosin (I-IV), Carnosin-Synthase (V-VIII) und dem olfaktorischen Markerprotein (OMP) (IX-XII), das spezifisch in Riechsinneszellen exprimiert wird. Abbildung 5.4 A zeigt deren Lokalisation im Riechepithel von Wildtyp- und *Carns1-knock-out*-Geweben. Dargestellt ist ein Ausschnitt der koronalen Gefrierschnitte von dekalzifizierten Mausschädeln, der in Abbildung 5.2 durch den blauen Kasten gekennzeichnet ist. Am deutlichsten ist das in rot dargestellte Signal der Carnosin- und Carnosin-Synthase-Färbung in den Strängen rechts und links neben der Nasenscheidewand im Wildtyp zu erkennen. Die ähnliche Färbung gegen OMP zeigt an, dass es sich hierbei um die Axonbündel der Riechsinneszellen handelt. Aufgrund des schwachen Signals in der OMP-Färbung und der daraus folgenden langen Belichtungszeit ist der Hintergrund, der auch in der Sekundärantikörperkontrolle (Abbildung 5.4 B IX-XII) zu sehen ist, sehr stark. Im direkten Vergleich der OMP-Färbung und der zugehörigen Sekundärantikörperkontrolle, ist dennoch das spezifische Signal in den Axonbündeln zu erkennen. Im *Carns1-knock-out*-Gewebe konnten wie erwartet Carnosin und Carnosin-Synthase nicht detektiert werden, wohingegen OMP im Wildtyp- und *Carns1-knock-out*-Gewebe ähnliche Signale aufzeigt. Des Weiteren konnte kein Hinweis auf einen Verlust von Rezeptorneuronen beim *Carns1-knock-out*-Gewebe gefunden werden.

In Abbildung 5.4 C ist die Immunfärbung mit Antikörpern gegen Carnosin-Synthase im Riechhirn von sagittalen Gehirnschnitten von Wildtyp- (I und II) und *Carns1-knock-out*-Mäusen (III und IV) abgebildet. Wie zu erkennen ist, ist die Carnosin-Synthase im Wildtyp-Gewebe hauptsächlich in der *Glomeruli olfactorii*-Schicht des Riechhirns lokalisiert, also dort, wo die Axone der Riechsinneszellen enden. In der Kernfärbung (DAPI) werden die kreisförmigen *Glomeruli* dieser Schicht deutlich.

In Abbildung 5.4 B und D sind die Sekundärantikörperkontrollen zu sehen, bei denen jeweils auf die Primärantikörper verzichtet wurde. Sie stellen somit den vom Sekundärantikörper erzeugten unspezifischen Hintergrund dar.



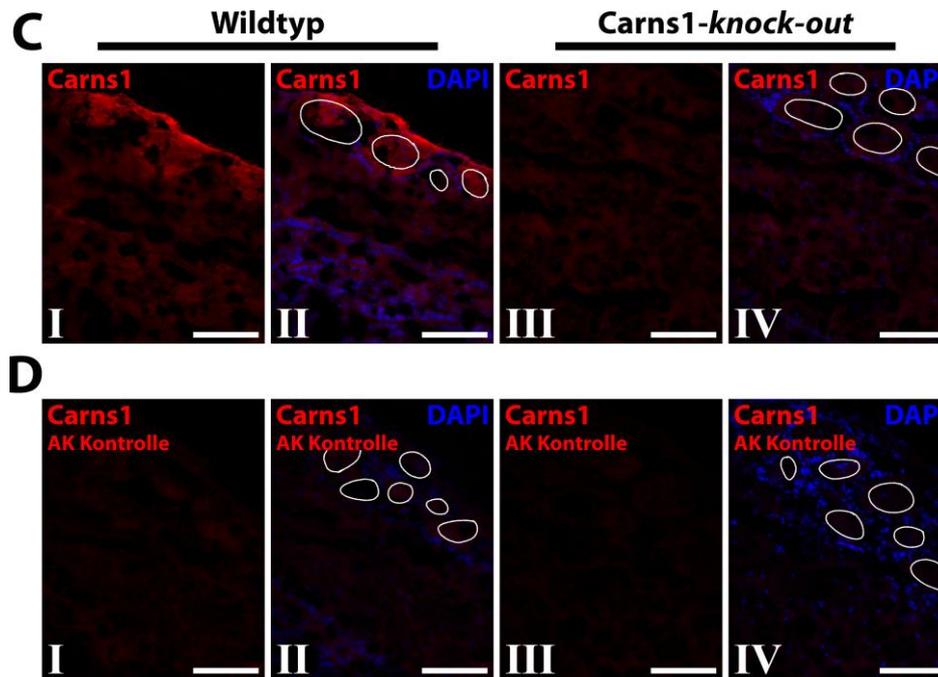


Abbildung 5.4: Immunfluoreszenzmikroskopie des Riechepithels und Riechhirns.

A und **B**: Gefärbt wurden 10 µm dicke direkt aufeinanderfolgende koronale Gefrierschnitte der Nase dekalzifizierter Mausschädel. Abgebildet ist jeweils ein Abschnitt des Riechepithels mit der Nasenscheidewand, wie in Abbildung 5.2 durch das blaue Rechteck dargestellt. (**A**) Die Wildtyp- und Carns1-knock-out-Schnitte wurden zunächst mit Antikörpern gegen Carnosin (I-IV; rb-a-Carnosin), Carnosin-Synthase (Carns1; gp-a-Carns1-C) (V-VIII) oder OMP (*olfactory marker protein*) (IX-XII; rb-a-OMP) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Cy3 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Cy3-a-rb) bzw. Ziege-anti-Meerschweinchen-Antikörper (Cy3-a-gp) verwendet, die zusammen mit DAPI inkubiert wurden. **C** und **D**: Gefärbt wurden 10 µm dicke sagittale Gefrierschnitte von Wildtyp- (I und II) und Carns1-knock-out-Mausgehirnen (III und IV). Abgebildet ist jeweils die *Glomeruli olfactorii*-Schicht des Riechhirns, wobei die Riechhirnoberfläche nach oben rechts orientiert ist. (**C**) Die Schnitte wurden zunächst mit Antikörpern gegen Carnosin-Synthase inkubiert, bevor als Sekundärantikörper Cy3 gekoppelter Ziege-anti-Meerschweinchen-Antikörper eingesetzt wurde, der zusammen mit DAPI inkubiert wurde. (**B** und **D**) In den Antikörperkontrollfärbungen wurde jeweils auf den Primärantikörper verzichtet. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. AB = Axonbündel, BG = Blutgefäß, RE = Riechepithel. Durch weiße Kreise gekennzeichnet sind die Glomeruli der *Glomeruli olfactorii*-Schicht des Riechhirns.

Starke Carnosin-Signale konnten außerdem in Immunfluoreszenzanalysen im Riechepithel des Vomeronasalorgans detektiert werden. Die Lage des Vomeronasalorgans in koronalen Gewebeschnitten ist in Abbildung 5.2 gekennzeichnet. Die entsprechenden Immunfärbungen der direkt aufeinander folgenden Serienschnitte mit Antikörpern gegen Carnosin (I-IV) und Carnosin-Synthase (V-VIII) sind in Abbildung 5.5 A dargestellt. Im Wildtyp-Gewebe sind deutlich die Carnosin- und Carnosin-Synthase-Signale in den Rezeptorneuronen zu erkennen. Carnosin scheint dabei auch an der Epitheloberfläche in den Riechkolben der Rezeptorneurone lokalisiert zu sein. Im Carns1-knock-out-Gewebe konnten wie erwartet weder Carnosin- noch Carnosin-Synthase-Signale

detektiert werden. In Abbildung 5.5 B sind die Sekundärantikörperkontrollen zu sehen, die den vom Sekundärantikörper erzeugten unspezifischen Hintergrund darstellen.

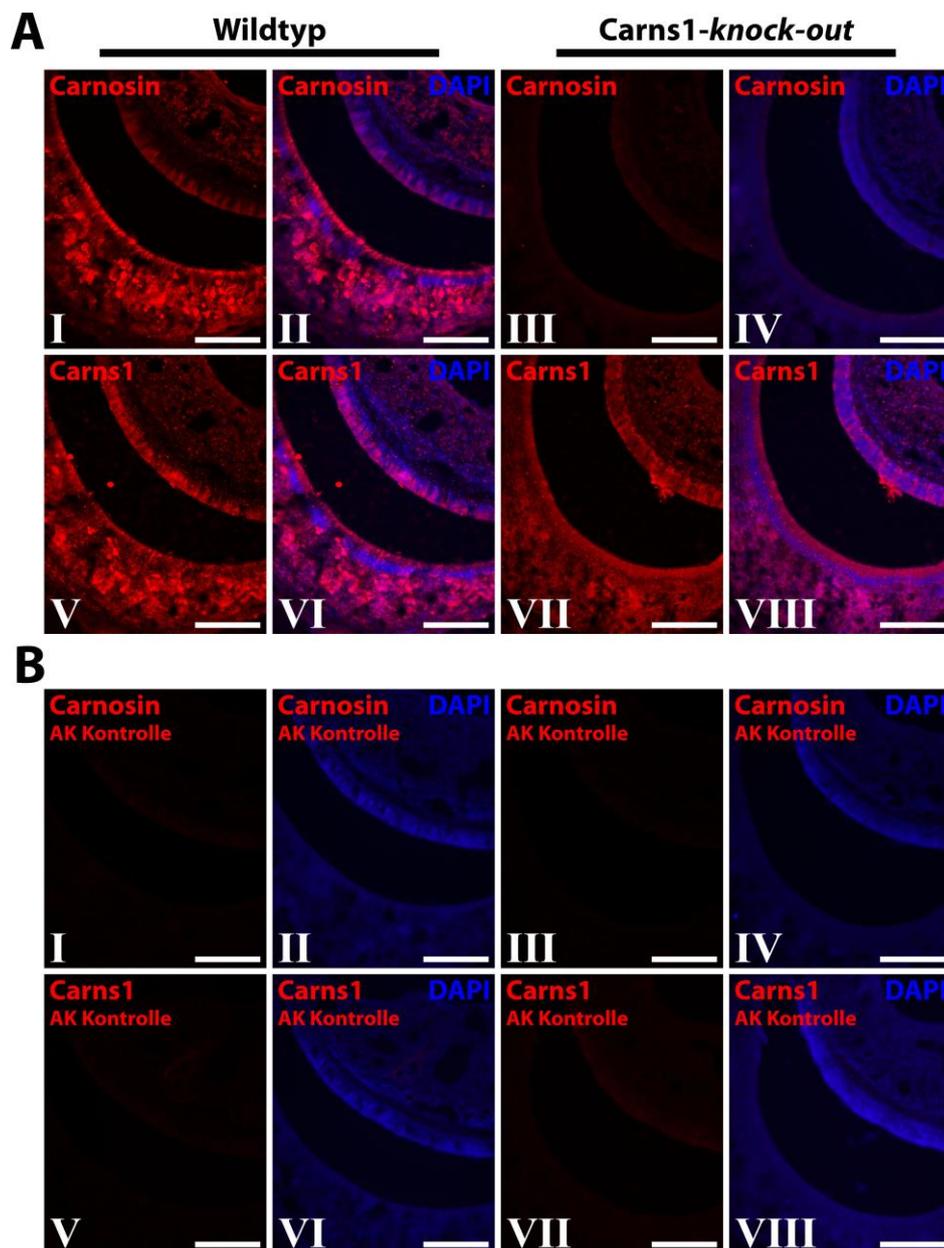


Abbildung 5.5 Immunfluoreszenzmikroskopie des Vomeronasalorgans.

Gefärbt wurden 10 µm dicke direkt aufeinanderfolgende koronale Gefrierschnitte der Nase dekalzifizierter Mausschädel. Abgebildet ist jeweils ein Ausschnitt des Vomeronasalorgans. (A) Die Wildtyp- und Carns1-knock-out-Schnitte wurden zunächst mit Antikörpern gegen Carnosin (I-IV; rb-a-Carnosin) oder Carnosin-Synthase (Carns1; gp-a-Carns1-C) (V-VIII) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Cy3 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Cy3-a-rb) bzw. Ziege-anti-Meerschweinchen-Antikörper (Cy3-a-gp) verwendet, die zusammen mit DAPI inkubiert wurden. (B) In den Antikörperkontrollfärbungen wurde jeweils auf den Primärantikörper verzichtet. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

5.1.3 Dünnschichtchromatographie

Um das Vorkommen des Dipeptids Carnosin in verschiedenen Mausgeweben zu analysieren, wurden Peptidextrakte hergestellt, die anschließend durch Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und mit Ninhydrinlösung angefärbt wurden. Abbildung 5.6 A zeigt die aufgetrennten Riechhirn- und Riechepithelpeptidextrakte von je drei Wildtyp- und Carns1-*knock-out*-Tieren, wobei die Riechepithelien der drei Tiere jeweils vereint wurden, um ausreichend Material zu erhalten. In Abbildung 5.6 B sind die aufgetrennten Peptidextrakte von Vorderhirn, Klein- und Stammhirn, Herz, Skelettmuskel, Leber und Niere von jeweils drei Wildtyp-Tieren zu sehen. Carnosin konnte nur im Riechhirn, Riechepithel und Skelettmuskel detektiert werden, nicht dagegen in Vorderhirn, Klein- und Stammhirn, Herz, Leber und Niere. Auf beiden DC-Platten wurde ein Carnosin-Standard aufgetragen, um die Signale densitometrisch quantifizieren zu können. Die Signale der DC wurden hierfür digital auf ihre Blau- und Cyan-Töne reduziert. In Abbildung 5.6 C sind die Carnosin-Konzentrationen von Riechhirn, Riechepithel und Skelettmuskel dargestellt. Die höchste Konzentration des Dipeptids konnte mit $2,49 \pm 0,22$ nmol/mg (Mittelwert \pm SD (Standardabweichung; engl.: *standard deviation*), $n = 3$) Feuchtgewicht des Gewebes im Skelettmuskel nachgewiesen werden. Im Riechhirn konnten $1,23 \pm 0,04$ nmol/mg (Mittelwert \pm SD, $n = 3$) detektiert werden und im Riechepithel $1,52$ nmol/mg ($n = 1$).

Weitere Analysen ergaben, dass die untere der beiden blauen Banden in den DC-Analysen der Skelettmuskelproben auf das Peptid Anserin zurückgeführt werden kann. Zum einen ist sie in den Skelettmuskelpeptidextrakten von Carns1-*knock-out*-Tieren nicht detektierbar und zeigt zum anderen dasselbe Laufverhalten wie der Anserin-Standard (Daten nicht gezeigt).

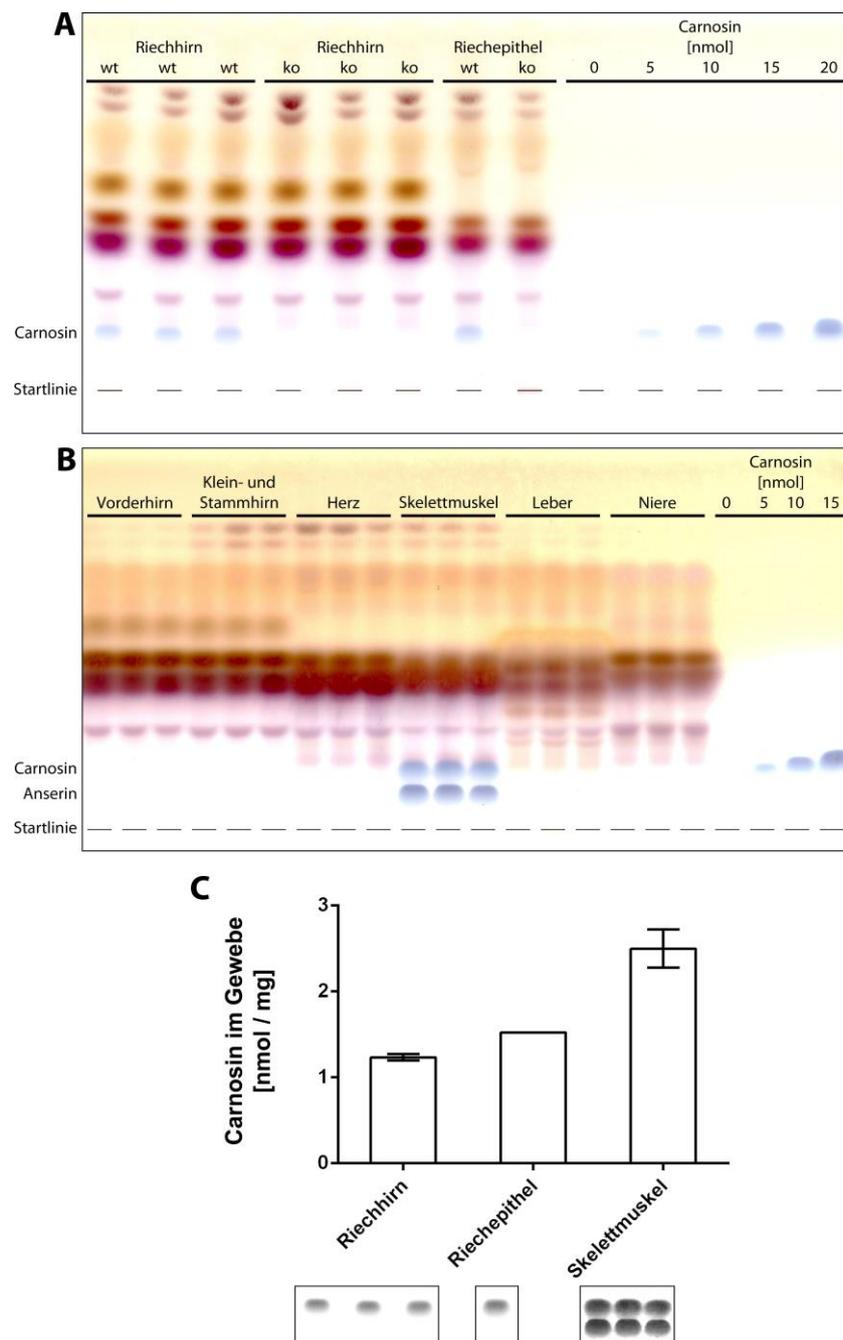


Abbildung 5.6: Dünnschichtchromatographie von Peptidextrakten.

Zur Detektion von Carnosin in verschiedenen Mausgeweben erfolgte zunächst eine Peptidextraktion in 90 % (v/v) Methanol. Die eingetrockneten Peptide wurden gemäß dem Feuchtgewicht der Organe in Wasser aufgenommen und entsprechend 5 mg des ursprünglichen Feuchtgewichtes auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (DC-Platte) aufgetragen. Die Proben wurden anschließend in einem Butanol-Essigsäure-Wasser-Gemisch (50:25:25) chromatographisch aufgetrennt und mit einer Ninhydrin-Lösung angefärbt. **(A)** Aufgetragen wurden Peptidextrakte von Riechhirn und Riechepithel von je drei Wildtyp- bzw. Carns1-knock-out-Tieren neben einem Carnosin-Standard, wobei die Riechepithelien für die Peptidextraktion vereint wurden. Wt = Wildtyp, ko = Knock-out. **(B)** Auf einer zweiten DC-Platte wurden Peptidextrakte von Vorderhirn, Klein- und Stammhirn, Herz, Skelettmuskel, Leber, und Niere von je drei Wildtyp-Tieren neben einem Carnosin-Standard aufgetragen. **(C)** Die Quantifizierung der Wildtyp-Signale von Riechhirn, Riechepithel und Skelettmuskel erfolgte densitometrisch. Um dies zu erleichtern wurden die Signale der DC digital auf ihre Blau- und Cyan-Töne reduziert. Dargestellt ist die Menge an Carnosin (nmol) im Gewebe pro Milligramm Feuchtgewicht, wobei mit Ausnahme des Riechepithels (Gewebe von drei Tieren vereint) die Mittelwerte (\pm SD) von drei Tieren dargestellt sind.

5.1.4 *In situ* Hybridisierung und Northern Blot-Analysen

Mittels *In situ* Hybridisierung an Riechepithel und Riechhirn wurde untersucht, ob auch die mRNA für die Carnosin-Synthase in diesen beiden Geweben nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden Paraffinschnitte des Riechepithels und des Gehirns von Wildtyp- und *Carns1-knock-out*-Mäusen angefertigt und mit DIG-markierten RNA-Sonden gegen die Carnosin-Synthase-mRNA behandelt. In Abbildung 5.7 ist ein Ausschnitt des Riechepithels und das Riechhirn von Wildtyp- und *Carns1-knock-out*-Tieren dargestellt. Im Riechepithel der Wildtyp-Maus ist ein deutliches Signal (braun-lila) in der Schicht zu sehen, in der die Zellkörper der Riechsinneszellen liegen (Abbildung 5.7 A). Im Gegensatz dazu konnte die mRNA der Carnosin-Synthase im Riechhirn nicht detektiert werden (Abbildung 5.7 C). Die Färbungen des *Carns1-knock-out*-Gewebes zeigt wie erwartet weder im Riechepithel noch im Riechhirn ein Signal (Abbildung 5.7 B und D).

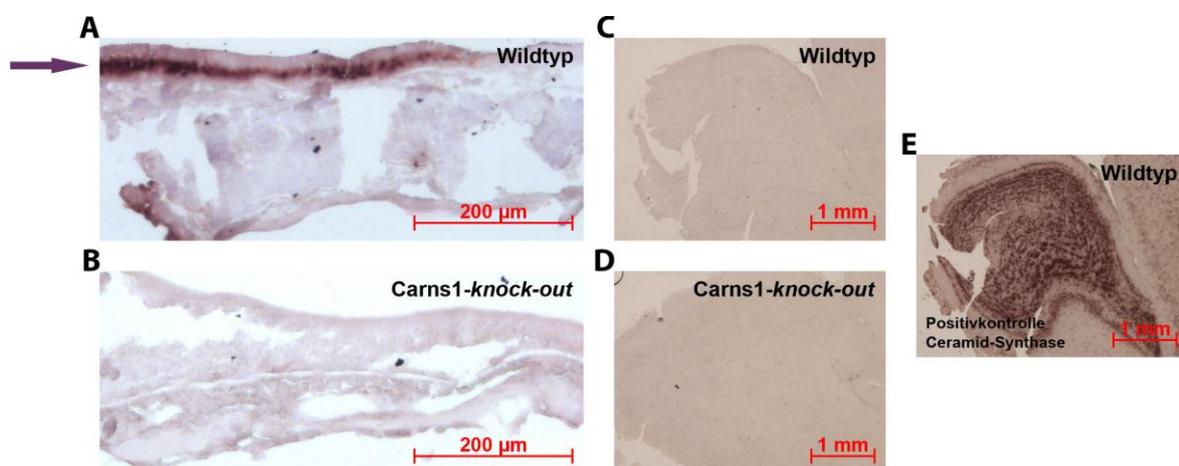


Abbildung 5.7: *In situ* Hybridisierung.

Verwendet wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte des Riechepithels (koronal) und des Gehirns (sagittal) von Wildtyp- und *Carns1-knock-out*-Mäusen. Dargestellt sind jeweils ein Ausschnitt des Riechepithels (A und B), wobei die Nasenhöhle nach oben orientiert ist, und das Riechhirn (C und D). Die mRNA für die Carnosin-Synthase wurde mithilfe spezifischer DIG-markierter RNA-Sonden (Antisense-Sonden) und alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-DIG-Antikörper detektiert. Eine lila-bräunliche Färbung (Pfeil) zeigt das Vorhandensein der Carnosin-Synthase-mRNA an. (E) Als Positivkontrolle für die Färbung der Gehirnschnitte wurden für die Ceramid-Synthase spezifische DIG-markierte RNA-Sonden verwendet.

Die Spezifität der DIG-markierten RNA-Sonde für die Carnosin-Synthase-mRNA wurde mittels Northern-Blot-Analyse an Gesamt-RNA von Rückenmark, Riechhirn und Riechepithel überprüft. Dafür wurden Gewebeproben von Carns1-*knock-out*-, Carns1-heterozygot- und Wildtyp-Mäusen verwendet. Zur weiteren Kontrolle wurde bei den Riechepithelproben zusätzlich zur Markierung mit der Antisense-Sonde noch eine Analyse mit einer Sense-Sonde durchgeführt. Wie Abbildung 5.8 zeigt, konnte die Carnosin-Synthase-mRNA nur im Riechepithel mit der Antisense-Sonde detektiert werden, wobei die Signale im Carns1-heterozygot-Gewebe etwa halb so stark sind wie die im Wildtyp-Gewebe. Bei beiden Genotypen wurden jeweils drei Signale detektiert. Eins etwas unter 4.000 bp, eins über 4.000 bp und eins weit über 6.000 bp. Durch Extrapolation des Größenstandards, konnte für das obere Signal eine Größe von etwa 9.600 bp errechnet werden. Da alle drei Signale nicht im Carns1-*knock-out* jedoch im Heterozygot- und Wildtyp-Riechepithel detektiert werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei allen um ein spezifisches Signal handelt. Die mRNA der Carnosin-Synthase besteht aus 3.968 bp, was der kleinsten Bande im Northern Blot entsprechen könnte. Da die heterogene Kern-RNA (hnRNA: *engl. heterogeneous nuclear RNA*) der Carnosin-Synthase aus 11.156 bp besteht, könnte es sich bei der obersten Bande um diese ungespleißte RNA handeln. Die 18S und die 28S ribosomale RNA (rRNA), die im RNA-Gel zu sehen sind (nicht gezeigt) und hier im Northern Blot als helle Banden erscheinen, entsprechen einer Größe von ~1.900 bp bzw. ~4.700 bp. Da vor allem die 28S RNA eine dominante Bande darstellt, könnte es sein, dass sie die Carnosin-Synthase-mRNA auseinander getrieben hat, also nach oben und unten verdrängt hat, und diese somit als Doppelbande in Erscheinung tritt (< 4.000 bp und > 4.000 bp).

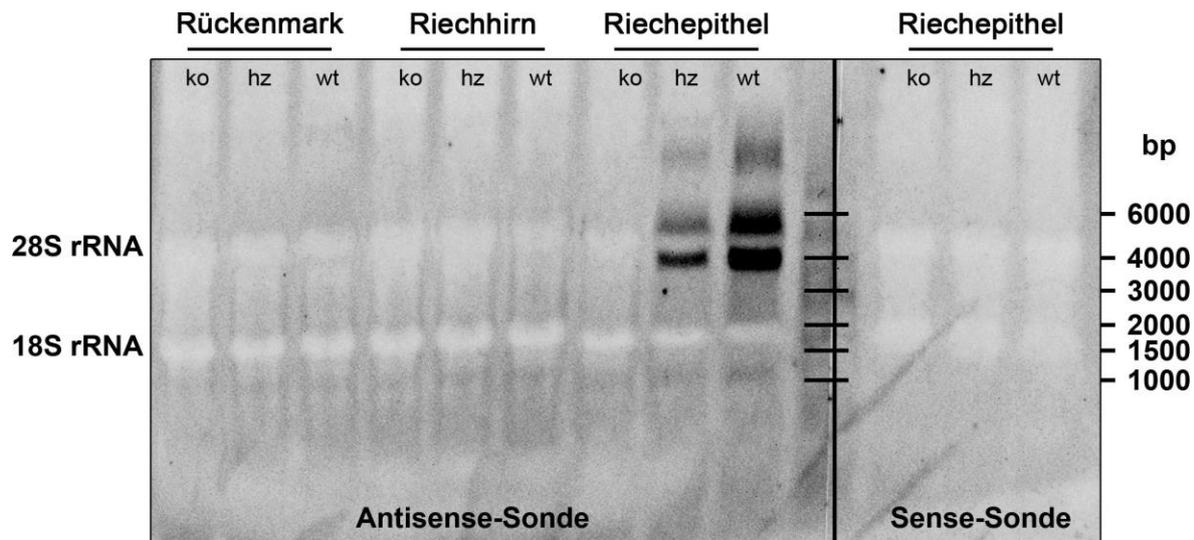


Abbildung 5.8: Northern Blot-Analyse.

Es wurden jeweils 17 µg Gesamt-RNA des Rückenmarks, des Riechhirns, und des Riechepithels von Wildtyp-, Carns1-heterozygot- und Carns1-*knock-out*-Mäusen auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Hierfür wurden die Organe von je sechs Tieren vereint. Zur Markierung der Carnosin-Synthase-mRNA auf der Nylonmembran wurde eine DIG-markierte RNA-Sonde (Antisense-Sonde) und alkalische Phosphatase gekoppelter anti-DIG-Antikörper eingesetzt, der mittels Chemilumineszenz detektiert wurde. Zur Kontrolle wurde eine Membran mit weiteren Riechepithel-RNA-Proben mit der entsprechenden Sense-Sonde inkubiert. Als helle Bande zu erkennen ist die 28S und 18S ribosomale RNA (rRNA). Ko = *Knock-out*, hz = Heterozygot, wt = Wildtyp.

5.1.5 Quantitative *real-time* PCR Analysen

Da zum Nachweis spezifischer RNA die Verfahren mit RNA-Sonden weniger sensitiv sind als Methoden, die auf dem Prinzip der PCR beruhen, wurden ergänzend quantitative *real-time* PCR-Analysen an Geweben von Wildtyp-, Carns1-heterozygot-, und Carns1-*knock-out*-Mäusen durchgeführt, um die Expression des Carnosin-Synthase-Gens zu untersuchen. Zunächst wurden Oligonukleotide eingesetzt, die in Exon 9 und 10 der mRNA binden. In Abbildung 5.9 sind die relativen mRNA-Level verschiedener Gewebe dargestellt. Als Referenzgen wurde RPS2 verwendet, da dies im Gegensatz zu anderen üblicherweise verwendeten Referenzgenen in den verschiedenen Geweben eine ähnliche Expression zeigte. Der Mittelwert der RPS2-Ct-Werte aller Messungen lag bei $17,51 \pm 0,695$ (Mittelwert \pm SD).

In Wildtyp-Tieren konnte im Vorderhirn, Kleinhirn, Skelettmuskel, Herz, Milz, Thymus, und Riechhirn eine geringe Expression der Carnosin-Synthase-mRNA gemessen werden (relative Expressionswerte: 1,21 – 3,38). Etwas stärker

exprimiert ist diese in Stammhirn und Rückenmark (relative Expressionswerte: 6,29 und 7,43). In Leber, Niere und Lunge konnten nur sehr niedrige mRNA-Level gemessen werden (relative Expressionswerte: 0,05-0,47). Dennoch erscheinen all diese mRNA-Level im Vergleich zum Riechepithel (relativer Expressionswert: 127,87) verschwindend gering, in dem eine 15- bis 40-fach stärkere Expression gemessen wurde. In *Carns1-knock-out*-Gewebe konnte die mRNA wie erwartet nicht detektiert werden, während in den *Carns1*-heterozygot-Gewebe Expressionslevel gemessen wurden, die in etwa der Hälfte des Wildtyps entsprechen. Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Größe der amplifizierten DNA überprüft. Ebenfalls in Abbildung 5.9 abgebildet sind beispielhaft die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte von Rückenmark, Skelettmuskel, Leber und Riechepithel mit der erwarteten Größe von 109 bp. Zusammengefasst lässt sich daraus erkennen, dass die bei der quantitativen *real-time* PCR gemessenen Signale auf die Amplifikation der für die Carnosin-Synthase spezifischen cDNA zurückgeführt werden können.

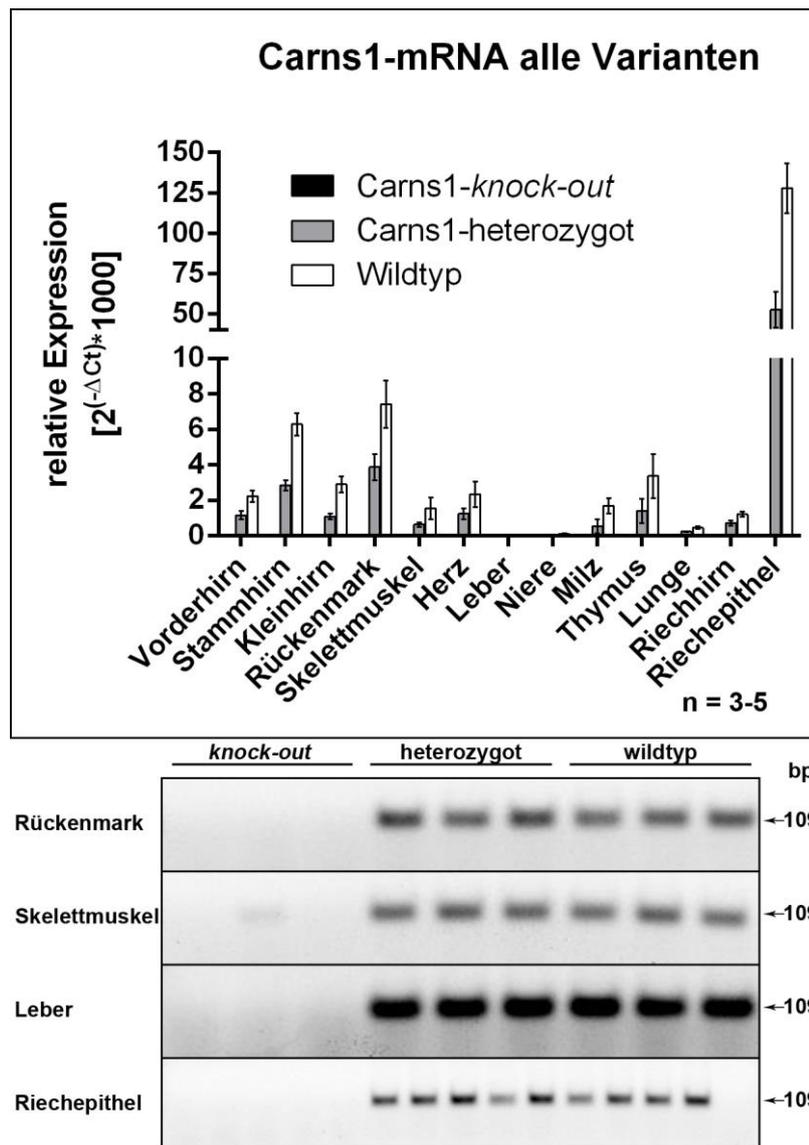


Abbildung 5.9: Quantitative *real-time* PCR-Analyse der Carnosin-Synthase.

Dargestellt sind die relativen Carns1-mRNA-Level von Wildtyp-, Carns1-heterozygot- und Carns1-*knock-out*-Mäusen in verschiedenen Geweben. Hierfür wurde zunächst die RNA aus dem entsprechenden Gewebe isoliert und gereinigt, mittels reverser Transkription in cDNA übersetzt und durch quantitative *real-time* PCR analysiert. Verwendet wurden Oligonukleotide spezifisch für die mRNA der Carnosin-Synthase (Oligonukleotid # 5+6) und des ribosomalen Proteins S2 (RPS2) als Referenzgen (Oligonukleotid # 3+4). Die relativen mRNA-Level wurden anschließend durch die $2^{-(\Delta Ct)}$ -Methode berechnet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm SD) von 3 Tieren (5 bei Riechhirn und Riechepithel; Ausnahme Wildtyp-Riechepithel: 4). Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Beispielhaft abgebildet sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte von Rückenmark, Skelettmuskel, Leber und Riechepithel von jeweils einem Duplikat aller Wildtyp-, Carns1-heterozygot- und Carns1-*knock-out*-Tiere.

Betrachtet man den Genabschnitt, auf dem die Carnosin-Synthase kodiert ist, fällt auf, dass es außer der bislang untersuchten Variante noch zwei weitere potentielle Transkriptvarianten (X1 und X2) gibt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Gene ID: 107239). Die entsprechenden Proteine dieser beiden Transkriptvarianten haben

ein errechnetes Molekulargewicht von 94 kDa (X1) und 89 kDa (X2). Wie an den in Abbildung 5.10 schematisch dargestellten RNA-Sequenzen ersichtlich ist, sind die letzten sechs von insgesamt zehn Exons der normalen Variante bei allen Transkriptvarianten gleich. Mit den Oligonukleotiden #5+6, die für die quantitative *real-time* PCR-Analyse der Abbildung 5.9 verwendet wurden, konnte demnach die mRNA aller Transkriptvarianten nachgewiesen werden. Zusätzlich gibt es komplementär zu den Transkriptvarianten der Carnosin-Synthase eine lange nicht-kodierende RNA (*lncRNA*: engl. *long non-coding RNA*). Die lncRNA hat kein offenes Leseraster und ist komplementär zur mRNA. Generell können lncRNAs verschiedene Funktionen haben. Für einige wurde gezeigt, dass sie regulatorische Aufgaben in der Transkription (Goodrich und Kugel, 2006) bzw. Translation (Wang et al., 2005) haben. Bei manchen, zunächst als lncRNA identifizierten RNAs, stellte sich allerdings im Nachhinein heraus, dass sie doch kleine offene Leseraster hatten und in Proteine translatiert wurden und somit keine lncRNAs waren (Smith et al., 2014).

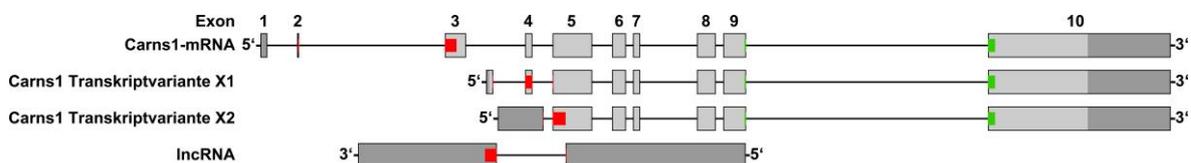


Abbildung 5.10: Schematischer RNA-Sequenz-Vergleich.

Dargestellt sind die RNA-Sequenzen aus dem Genabschnitt, in dem die Carnosin-Synthase kodiert ist. Von oben nach unten abgebildet ist die Exon-Nummerierung der darunter dargestellten Carns1-mRNA, die mRNAs der beiden potentiellen Transkriptvarianten X1 und X2 und die lncRNA, die allerdings komplementär zu den anderen RNAs läuft. Der kodierende Bereich ist jeweils in hellgrau gekennzeichnet. In grün dargestellt ist das erwartete PCR-Produkt der quantitativen *real-time* PCR mit den Oligonukleotiden #5+6, wodurch die RNA aller Transkriptvarianten nachgewiesen werden kann. In rot dargestellt sind die erwarteten PCR-Produkte, die mit den Oligonukleotiden entstehen, die spezifisch für die drei Transkriptvarianten bzw. die lncRNA sind.

Im Weiteren erfolgte die Untersuchung der Expression der verschiedenen Transkriptvarianten und der lncRNA mit jeweils spezifischen Oligonukleotiden. Um auszuschließen, dass mit den Oligonukleotidpaaren auch die ungespleißte heterogene Kern-RNA (hnRNA) amplifiziert wird, überspannt jeweils mindestens einer der beiden Oligonukleotide einen Exon-Exon-Übergang. In Abbildung 5.11

sind die entsprechenden RNA-Level der verschiedenen Gewebe von Carns1-*knock-out*-, Carns1-heterozygot und Wildtyp-Tieren dargestellt.

Aus Abbildung 5.11 A geht hervor, dass die Carns1-mRNA nur im Riechepithel deutlich detektiert werden konnte. Wie in den beispielhaft abgebildeten gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkten von Rückenmark, Skelettmuskel, Leber und Riechepithel zu sehen ist, wurde nicht bei allen Geweben ein PCR-Produkt der erwarteten Größe (155 bp) amplifiziert. Auch innerhalb eines Genotyps wurden unterschiedliche PCR-Produkte amplifiziert. In einigen Carns1-heterozygot- und Wildtyp-Geweben wurden DNA-Abschnitte mit einer Größe amplifiziert, die nicht dem erwarteten Fragment entsprachen, und zwar besonders in Geweben, in denen nur wenig Carns1-mRNA vorlag. Für die Auswertung wurden die Ct-Werte der Reaktionsansätze mit einem PCR-Produkt der falschen Größe nicht mit berücksichtigt.

In Abbildung 5.11 B sind die relativen mRNA-Level der Transkriptvariante X1 dargestellt. Auch hier konnte die stärkste Expression im Riechepithel nachgewiesen werden. Kleinere Mengen konnten in Vorderhirn, Stammhirn, Rückenmark und Thymus detektiert werden. Die beispielhaft abgebildeten gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte zeigten in fast allen Carns1-heterozygot und Wildtyp-Geweben ein PCR-Produkt der erwarteten Größe (112 bp).

Bei der Untersuchung der Expression der Transkriptvariante X2, wie in Abbildung 5.11 C dargestellt, konnte dagegen die größte Expression in Herz und Skelettmuskel nachgewiesen werden. Im Riechepithel liegt das mRNA-Level dieser Transkriptvariante deutlich darunter. Wie in den beispielhaft dargestellten gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkten zu erkennen ist, hatte in allen Geweben das PCR-Produkt die erwartete Größe (109 bp), wenn eines amplifiziert wurden. In der Leber, die eine sehr niedrige Expression der Carnosin-Synthase aufweist, wurde zum Beispiel nicht in allen Carns1-heterozygot und Wildtyp-Proben DNA amplifiziert.

Die Analyse der lncRNA-Level, die in Abbildung 5.11 D dargestellt ist, zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie das der Transkriptvariante X2, mit stärkster

Expression in Herz und Skelettmuskel. Wie beispielhaft abgebildet, zeigten in dieser Analyse alle gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte von Carns1-heterozygot- und Wildtyp-Geweben die erwartete Größe (133 bp).

Zusammengefasst geht aus Abbildung 5.11 hervor, dass die Carns1-mRNA und die Transkriptvariante X1 hauptsächlich in Nervengewebe, und dabei am stärksten im Riechepithel, exprimiert ist. Dagegen findet sich die mRNA der Transkriptvariante X2 und auch die lncRNA hauptsächlich in Muskelgewebe (Herz und Skelettmuskel). Hervorzuheben ist ebenfalls, dass im Riechhirn alle Transkriptvarianten nur sehr schwache Expressionen zeigen, obwohl in der Western Blot-Analyse in Abbildung 5.1 die Lokalisation der Carnosin-Synthase mit einem starken Signal im Riechhirn zu sehen ist.

5 Ergebnisse

■ Carns1-knock-out ■ Carns1-heterozygot □ Wildtyp

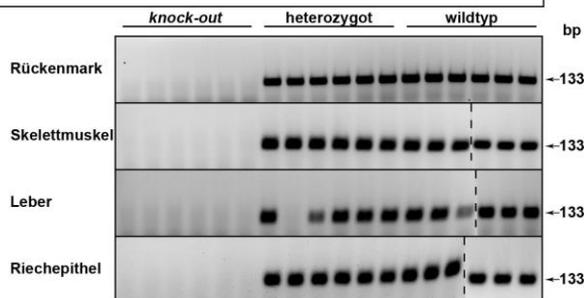
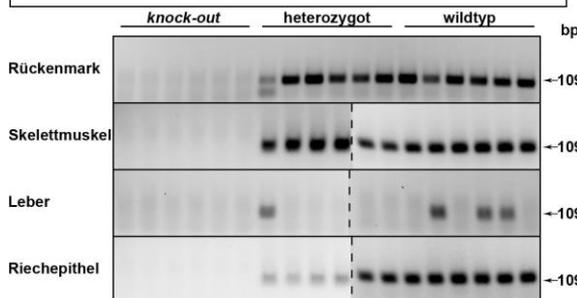
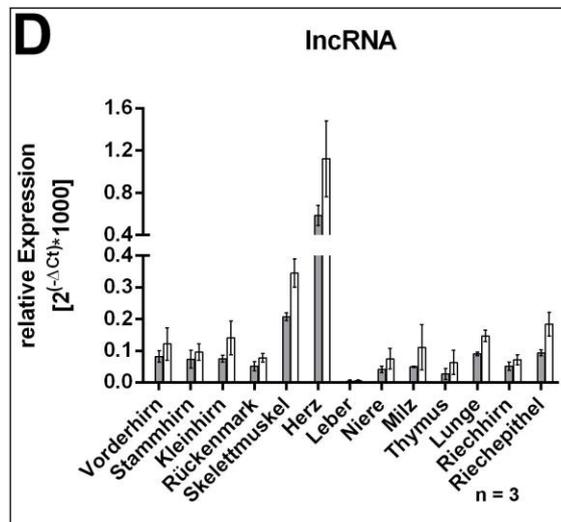
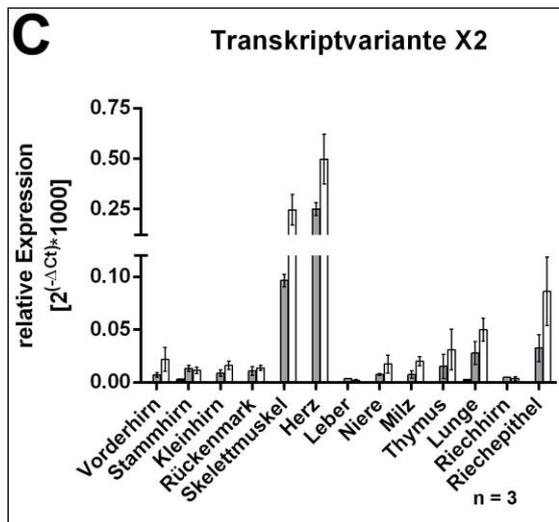
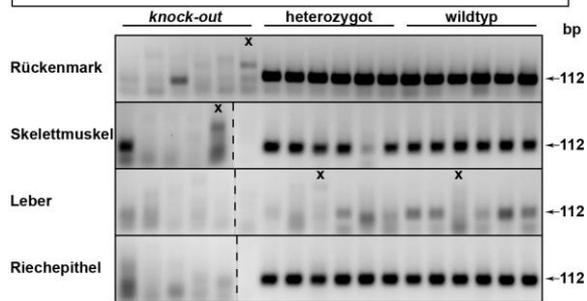
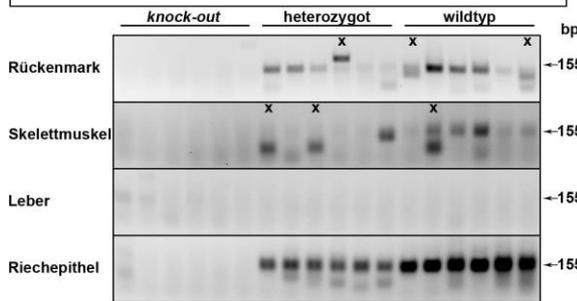
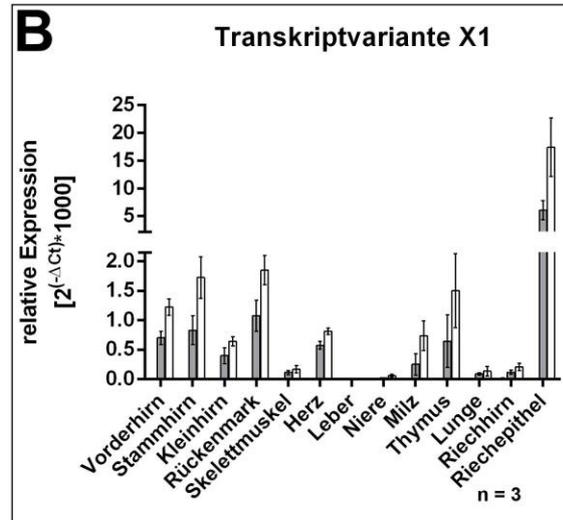
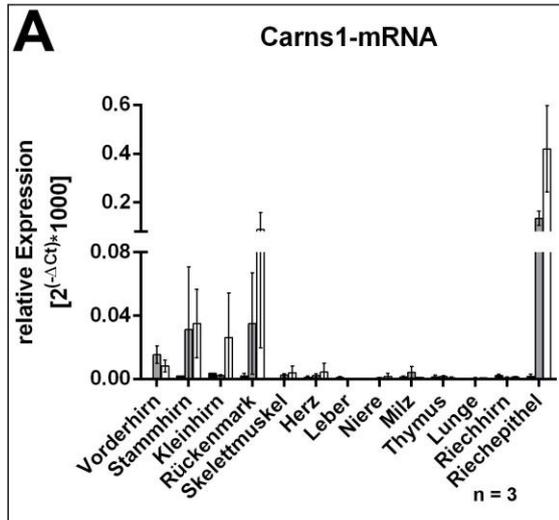


Abbildung 5.11: Quantitative *real-time* PCR-Analyse der einzelnen Transkriptvarianten und lncRNA.

Dargestellt sind die relativen RNA-Level von Wildtyp-, Carns1-heterozygot- und Carns1-*knock-out*-Mäusen in verschiedenen Geweben. Nach Isolierung der RNA aus dem entsprechenden Gewebe wurde diese gereinigt und mittels inverser Transkription in cDNA übersetzt. Die quantitative *real-time*-PCR-Analyse erfolgte mit Oligonukleotiden spezifisch für die Carns1-mRNA (Oligonukleotid # 7+8) (A), die Transkriptvariante X1 (Oligonukleotid # 9+10) (B), die Transkriptvariante X2 (Oligonukleotid # 11+12) (C) und die lncRNA (Oligonukleotid # 13+14) (D). Als Referenz diente das Gen für das ribosomale Protein S2 (RPS2) (Oligonukleotid # 3+4). Die relativen RNA-Level wurden anschließend durch die $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ -Methode berechnet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm SD) von 3 Tieren. Die Proben wurden jeweils in Duplikaten vermessen. Beispielhaft abgebildet sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte von Rückenmark, Skelettmuskel, Leber und Riechepithel von jeweils allen Wildtyp-, Carns1-heterozygot- und Carns1-*knock-out*-Tieren (3 Tiere in Duplikaten). Reaktionsansätze mit falschen PCR-Produkten wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt (X).

5.1.6 Altersabhängige Zunahme der Konzentration von Carnosin-Synthase und Carnosin im Gewebe

Zur Untersuchung der altersabhängigen Konzentration der Carnosin-Synthase wurden Western Blot-Analysen an Gewebehomogenaten von Wildtyp-Tieren verschiedenen Alters (P1, P10, P20, P60, 12 Monate und 22 Monate) durchgeführt. Verwendet wurden dafür Homogenate vom Riechhirn, da in diesem große Mengen der Carnosin-Synthase nachgewiesen wurden (vergleiche Abbildung 5.1). Das Riechepithel konnte nicht für die Analysen verwendet werden, da dessen Extraktion aus jungen Mäusen (\leq P10) nicht möglich war. Damit von jeder Altersstufe dieselbe Menge Gesamtprotein eingesetzt werden konnte, wurden die Riechhirne für die Altersstufe P1 dreimal von je vier Tieren und für P10 dreimal von je drei Tieren vereint, um ausreichend Material der jungen Altersstufen zu erhalten. Die densitometrische Quantifizierung dieser Western Blot-Analyse, die in Abbildung 5.12 A dargestellt ist, zeigt einen Anstieg der Carnosin-Synthase-Konzentration mit zunehmendem Alter im Riechhirn. Dieser ist bis zu einem Alter von P60 jeweils zur vorherigen Altersstufe signifikant. Um die gleichmäßige Beladung von 50 μ g Gesamtproteinmengen zu zeigen, ist in Abbildung 5.12 B die Coomassie-gefärbte PVDF-Membran abgebildet.

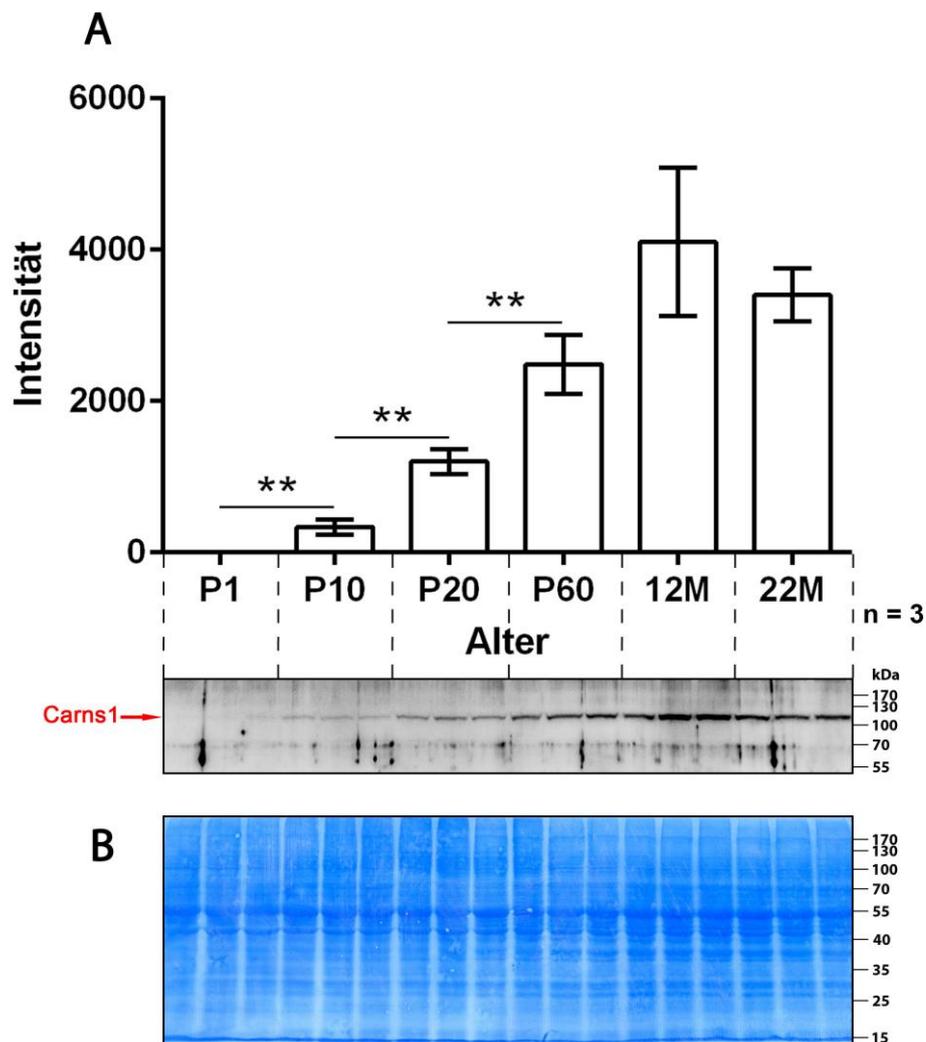


Abbildung 5.12: Altersabhängige Carnosin-Synthase-Konzentration im Riechhirn.

Die Riechhirne von P1, P10, P20, P60, 12 Monate und 22 Monate alten Wildtyp-Mäusen wurden homogenisiert und anschließend der Gesamtproteingehalt der Homogenate bestimmt. Je 50 µg Gesamtprotein der Riechhirn-Homogenate wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Das Western Blot-Verfahren erfolgte auf eine PVDF-Membran, wobei der verwendete Primärantikörper gegen die C-terminale Hälfte der murinen Carnosin-Synthase gerichtet ist und als Sekundärantikörper Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Meerschweinchen-Antikörper verwendet wurde. Zur Detektion wurde die verstärkte Chemilumineszenz (ECL) eingesetzt. Analysiert wurden drei Tiere je Altersstufe, wobei für die jungen Altersstufen P1 bzw. P10 die Riechhirne von je dreimal vier bzw. dreimal drei Tieren gemeinsam homogenisiert wurden. (A) Dargestellt ist die relative Intensität der densitometrisch quantifizierten Western Blot-Signale (Mittelwert ± SD, t-Test, ** p < 0,005) der Carnosin-Synthase (errechnetes Molekulargewicht: ~102 kDa) von drei Gewebekomponenten je Altersstufe mit dem entsprechenden Ausschnitt der Western Blot-Analyse. (B) Coomassie-gefärbte PVDF-Membran zur Kontrolle der gleichmäßig eingesetzten Gesamtproteinmenge (50 µg).

Um die altersspezifische Konzentration des Dipeptids Carnosin im Gewebe zu untersuchen, wurden Peptidextrakte von Riechhirn und Skelettmuskel von Wildtyp-Tieren verschiedenen Alters hergestellt, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit Ninhydrin angefärbt. Analysiert wurden die Peptidextrakte von

je drei Tieren der Altersstufen P60, 12 Monaten und 19 Monaten. Um von den jungen Altersstufen P1, P10 und P20 jeweils genug Material zu erhalten, wurden hierfür die Organe von dreimal sechs Tieren für P1, von dreimal vier Tieren für P10 und von dreimal zwei Tieren für P20 vereint. In Abbildung 5.13 A und B sind die beiden Dünnschichtplatten abgebildet. Die untere der beiden blauen Banden in den Skelettmuskelproben entspricht Anserin (vergleiche Abschnitt 5.1.3) und wurde für die Quantifizierung nicht berücksichtigt. Zur densitometrischen Quantifizierung der Carnosin-Signale wurden die Signale der DCs auf ihre Blau- und Cyan-Töne reduziert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 5.13 C dargestellt.

Sowohl im Riechhirn als auch im Skelettmuskel stieg die Carnosin-Konzentration zunächst mit zunehmendem Alter an. Im Riechhirn ist der Anstieg von P 1 zu P 10 und von P10 zu P20 signifikant. Im Skelettmuskel hingegen ist nur der Unterschied von P1 zu P10 und von P60 zu 12M signifikant, wobei die höchste Carnosin-Konzentration im Skelettmuskel mit $2,10 \pm 0,22$ nmol/mg (Mittelwert \pm SD, $n = 3$) bei den 12 Monate alten Tieren gemessen werden konnte. Ab P20 konnte im Riechhirn keine signifikante Änderung der Carnosin-Konzentration mehr festgestellt werden und die höchste gemessene Konzentration beträgt $1,62 \pm 0,35$ nmol/mg (Mittelwert \pm SD, $n = 3$). Im Gegensatz dazu verringerte sich im Skelettmuskel die Konzentration von Carnosin bei 19 Monate alten Tieren im Vergleich zu den 12 Monate alten Tieren noch einmal signifikant und fällt auf eine Konzentration unterhalb des P10-Levels.

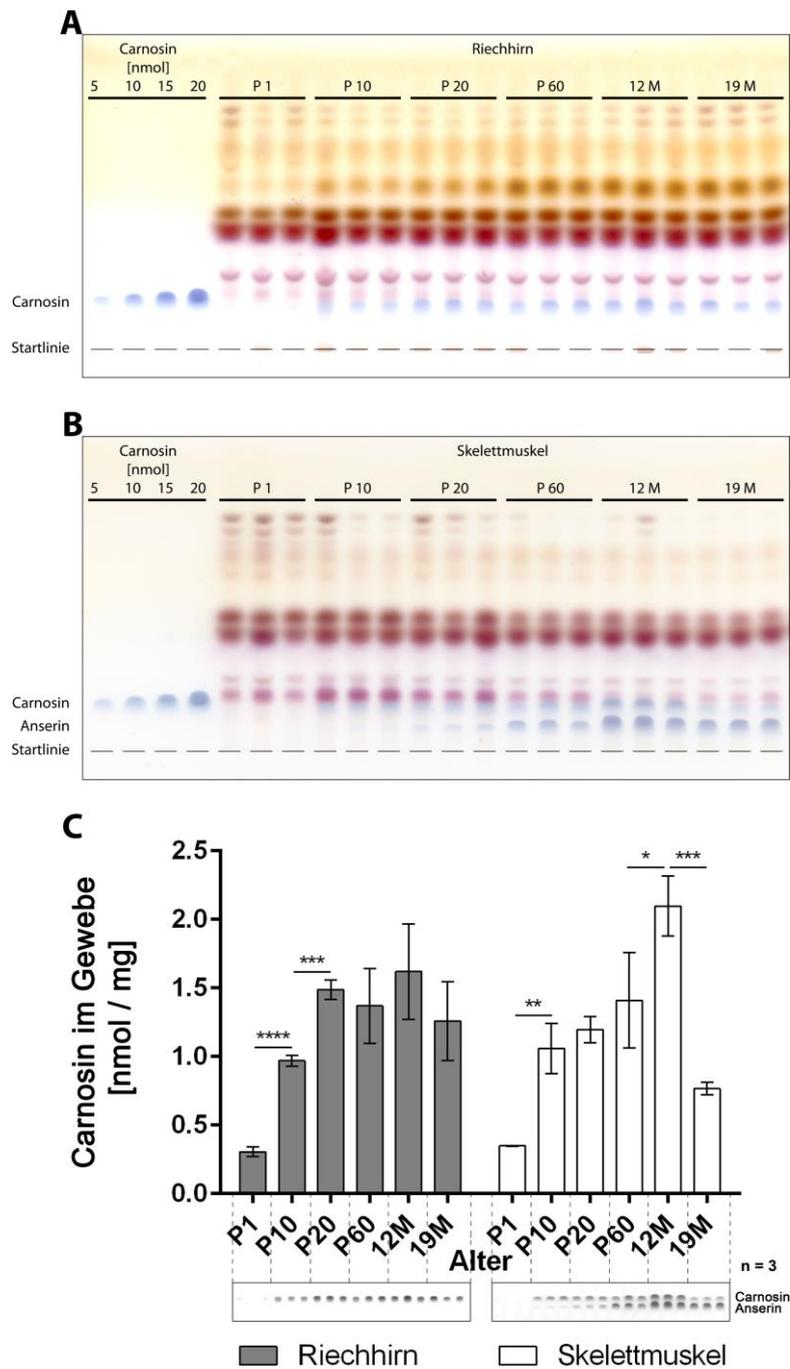


Abbildung 5.13: Altersabhängige Carnosin-Konzentration im Riechhirn und Skelettmuskel.

Zur Detektion von Carnosin im Riechhirn und Skelettmuskel von Mäusen verschiedenen Alters erfolgte zunächst eine Peptidextraktion in 90 % (v/v) Methanol. Die eingetrockneten Peptide wurden gemäß dem Feuchtgewicht der Organe in Wasser aufgenommen und entsprechend 5 mg des ursprünglichen Feuchtgewichtes auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Proben wurden anschließend in einem Butanol-Essigsäure-Wasser-Gemisch (50:25:25 (v/v/v)) chromatographisch aufgetrennt und mit einer Ninhydrin-Lösung angefärbt. Neben einer Carnosin-Standardreihe wurden jeweils Peptidextrakte von (A) Riechhirn und (B) Skelettmuskel von je drei Wildtyp-Tieren der Altersstufen P60, 12M und 19M auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Von den jungen Altersstufen P1, P10, P20 wurden die Organe von mehreren Tieren vor dem Homogenisieren vereint, für P1 von dreimal sechs Tieren, für P10 von dreimal vier Tieren und für P20 von dreimal zwei Tieren. (C) Die Quantifizierung der Signale, die dafür digital auf ihre Blau- und Cyan-Töne reduziert wurden, erfolgte densitometrisch. Dargestellt ist die Menge an Carnosin (nmol) im Gewebe pro Milligramm Feuchtgewicht (Mittelwert \pm SD, t-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ **** $p < 0,0001$) und der entsprechende Abschnitt der Dünnschichtchromatographie.

5.2 Heterologe Expression und Aktivitätsbestimmung

Eine nicht-radioaktive Methode zur Enzymaktivitätsbestimmung hat gegenüber einer radioaktiven zum einen den Vorteil, dass sie weniger zeit- und kostenintensiv ist, und zum anderen kann auf das Arbeiten mit radioaktivem Material verzichtet werden. Radioaktive Methoden sind in der Regel aber sehr viel sensitiver als nicht-radioaktive. Daher ist es für die Etablierung einer nicht-radioaktiven Methode notwendig, dass größere Mengen des zu untersuchenden Enzyms in möglichst hoher Reinheit vorliegen. Im Folgenden wird daher zunächst die Expression und Reinigung großer Mengen muriner Carnosin-Synthase gezeigt. Im Weiteren wurde eine nicht-radioaktive Methode zur Aktivitätsbestimmung etabliert und diese für erste enzymkinetische Charakterisierungen der Carnosin-Synthase verwendet.

5.2.1 Expression der murinen Carnosin-Synthase in Insektenzellen

Die Produktion der rekombinanten murinen Carnosin-Synthase erfolgte mithilfe des Baculovirus-Systems in Insektenzellen. Die cDNA-Sequenz der murinen Carnosin-Synthase wurde hierfür in einen entsprechenden Vektor (pUltraBac) kloniert, der bereits die Sequenz eines HST-Tags beinhaltet. Dieser besteht aus einem 6xHis-Tag, einem Twin-Strep-Tag® und einer TEV-Protease-Schnittstelle und ist der Carns1-cDNA vorgelagert. Der Vektor wurde zunächst in *E.coli* DH10Bac transformiert und die rekombinante Bacmid-DNA isoliert. Durch Transfektion von Sf-9-Zellen mit dieser Bacmid-DNA wurden entsprechende Baculoviren produziert, mit denen *High Five*-Zellen infiziert wurden. Diese produzierten dadurch die rekombinante murine Carnosin-Synthase. Die Affinitätsreinigung erfolgte aus den gewonnenen Zelllysaten über den His-Tag.

In Abbildung 5.14 sind die verschiedenen Fraktionen einer repräsentativen Reinigung im Coomassie-gefärbten SDS-Gel abgebildet. Die größte Menge des an das Säulenmaterial gebundenen Proteins ist nach Elution in Fraktion 4 bis 9 zu sehen, allerdings ist auch noch bis in Fraktion 15 Protein der erwarteten Größe (errechnetes Molekulargewicht HST-Carns1 ~107 kDa) vorhanden. Die

Eluatfraktionen 4 bis 12 wurden vereint und anschließend dialysiert (Molekulargewicht-Ausschlussgrenze: 12-14 kDa).

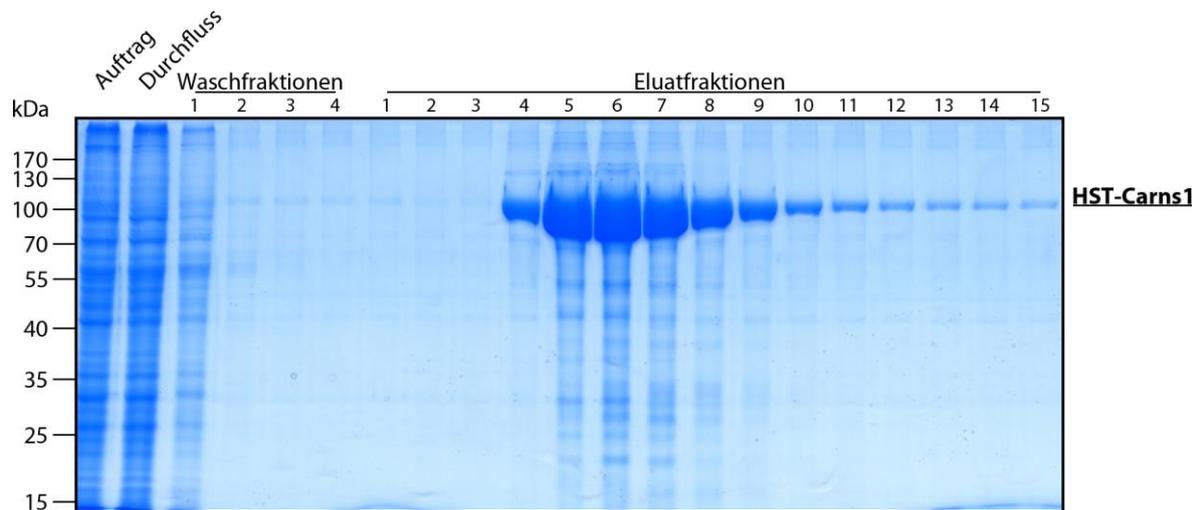


Abbildung 5.14: Fraktionen einer repräsentativen HST-Carns1-Affinitätsaufreinigung im SDS-Gel.

Die Reinigung der murinen HST-Carns1 erfolgte unter Verwendung einer Äkta-FPLC-Anlage. Die infizierten Insektenzellen (*High Five*) wurden lysiert, zentrifugiert und filtriert und auf eine equilibrierte Cobalt-Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend gewaschen, bevor das gebundene Protein in 15 Fraktionen (à 2 ml) eluiert wurde. Es wurden je 5 µl Probe (Auftrag, Durchfluss, Waschfraktionen 1-4, Eluatfraktionen 1-15) auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt. Errechnetes Molekulargewicht der HST-Carns1 ~107 kDa.

Abbildung 5.15 zeigt die Überprüfung einer Aufreinigung der rekombinanten murinen HST-Carnosin-Synthase, die ein errechnetes Molekulargewicht von ~107 kDa besitzt. Wie in Abbildung 5.15 A zu sehen ist, besteht das gereinigte rekombinante Enzym unter denaturierenden Bedingungen aus nur einem Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwas über 100 kDa. Außerdem sind keine deutlichen Verunreinigungen zu erkennen.

Wie in der Literatur bereits gezeigt wurde, liegt die Carnosin-Synthase unter nativen Bedingungen nicht als Monomer, sondern als Homotetramer von ~430 kDa vor (Drozak et al., 2010). Um dies für die gereinigte rekombinante Carnosin-Synthase ebenfalls zu zeigen, wurde eine Größenausschlusschromatographie angewandt. Dafür wurde diese zunächst mit Standardproteinen definierter Molekulargewichte und in einem zweiten Durchlauf

mit der HST-Carns1 durchgeführt. Detektiert wurde die Absorption der Proteine bei 280 nm. In Abbildung 5.15 B sind die Ergebnisse dieser Größenausschlusschromatographie unter nativen Bedingungen zu sehen. Im Durchlauf der HST-Carns1 ist nur ein einzelnes Signal zu erkennen, was auf eine hohe Reinheit des gereinigten Proteins schließen lässt. Vergleicht man diesen Durchlauf mit dem der Standardproteine, so kann davon ausgegangen werden, dass die rekombinante murine Carnosin-Synthase auch hier als Tetramer von ~440 kDa vorliegt, da im selben Elutionsbereich (~10 ml) des Standardprotein-Durchlaufs Ferritin (~440 kDa) detektiert wurde.

Mittels anschließender Western Blot-Analyse wurde sichergestellt, dass es sich bei dem gereinigten Protein um die Carnosin-Synthase handelte und der HST-Tag enzymatisch entfernt werden konnte. Hierfür wurde eine Probe des Dialysats mit rekombinanter TEV-Protease inkubiert, die ebenfalls einen His-Tag trägt. Sowohl die TEV-Protease als auch der abgeschnittene His-Strep-Tag konnten anschließend durch eine erneute Affinitätschromatographie über den His-Tag aus der Probe entfernt werden. Nur die Carnosin-Synthase, die keinen HST-Tag mehr trägt, bindet nicht an das Säulenmaterial und konnte direkt im Durchfluss aufgefangen werden. In Abbildung 5.15 C ist die entsprechende Western Blot-Analyse abgebildet. Diese wurde einmal mit einem anti-His-Tag-Antikörper und einmal mit einem anti-Carns1-Antikörper vor und nach Behandlung mit TEV-Protease und anschließender Reinigung durchgeführt. Wie zu erkennen ist, handelt es sich bei dem gereinigten Protein nachweislich um die Carnosin-Synthase und der HST-Tag konnte erfolgreich entfernt werden. Er ist in der Western Blot-Analyse gegen den His-Tag nach enzymatischem Verdau und Reinigung nicht mehr detektierbar. In der Analyse mit dem Antikörper gegen Carns1 hingegen kann das Enzym auch ohne HST-Tag nachgewiesen werden und der Unterschied im Molekulargewicht ist deutlich zu erkennen.

Mit dieser Reinigungsmethode konnten ~10 - 20 mg Carnosin-Synthase aus 1 l *High Five*-Suspensionskultur gewonnen werden. Für die folgenden Aktivitätsbestimmungen wurde die nicht mit TEV-Protease behandelte rekombinante HST-Carnosin-Synthase verwendet.

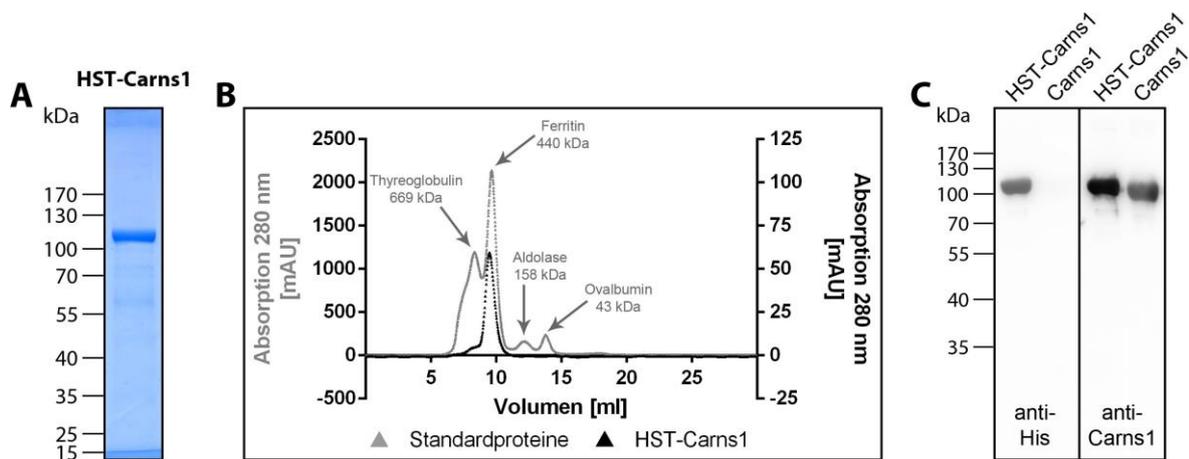


Abbildung 5.15: Kontrolle der Reinigung der rekombinanten murinen Carnosin-Synthase.

Die in Insektenzellen (*High Five*) produzierte rekombinante HST-Carns1 wurde mithilfe einer Cobalt-Säule über den His-Tag gereinigt, dialysiert und anschließend die Gesamteinkonzentration bestimmt. Errechnetes Molekulargewicht HST-Carns1 ~107 kDa. (A) 3,5 µg der gereinigten HST-Carns1 wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt. (B) Größenausschlusschromatographie der gereinigten HST-Carns1 und einer Lösung von Standardproteinen (Thyreoglobulin: 669 kDa, Ferritin: 440 kDa, Aldolase: 158 kDa und Ovalbumin: 43 kDa) in zwei getrennten Läufen. Verwendet wurde eine Superdex-200-Säule mit Dialysepuffer (Fließgeschwindigkeit 0,2 ml/min), wobei 285 µg HST-Carns1 bzw. je 1 mg der Standardproteine eingesetzt wurden. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm, wobei die Signale der Standardproteine auf der linken Y-Achse und die der HST-Carns1 auf der rechten Y-Achse aufgetragen sind. (C) Eine Probe des Dialysats wurde mit der TEV-Protease inkubiert und anschließend über eine Cobalt-Säule gegeben. Eine Kontrollprobe des Dialysats blieb ohne Behandlung. Je 1,5 µg HST-Carns1 bzw. Carns1 (TEV-Protease behandelt) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Für die Western Blot-Analyse wurde ein Antikörper verwendet, der gegen den N-terminalen Teil der Carnosin-Synthase (rb-a-Carns1-N) gerichtet ist bzw. ein anti-His-Antikörper (ms-a-His). Als Sekundäntikörper kamen Peroxidase gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen- (POX-a-rb) bzw. Ziege-anti-Maus-Antikörper (POX-a-ms) zum Einsatz. Zur Detektion wurde die verstärkte Chemilumineszenz (ECL) verwendet.

5.2.2 Prinzip der nicht-radioaktiven Enzymaktivitätsbestimmung

Die hier etablierte nicht-radioaktive Methode zur Bestimmung der Carnosin-Synthase-Aktivität beruht auf einer gekoppelten Reaktion. Wie in Abbildung 5.16 schematisch dargestellt ist, wird bei der durch die Carnosin-Synthase katalysierten Synthese von Carnosin aus β -Alanin und L-Histidin ein Molekül ATP zu ADP und anorganischem Phosphat (P_i) hydrolysiert. In der darauffolgenden Reaktion kann die Purinnukleosidphosphorylase (PNP) dieses freigesetzte P_i und das Substrat 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin-Ribonukleosid (MESG) nutzen. Dabei werden 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin und Ribose-1-Phosphat gebildet. Die Abspaltung der Ribose von dem Substrat MESG führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 330 nm zu 360 nm, was zur Detektion genutzt werden kann. Da die PNP eine mehr als 40-fach höhere Wechselzahl als die Carnosin-

Synthase hat, kann die Aktivität der Carnosin-Synthase absorptionspektroskopisch in Echtzeit verfolgt werden.

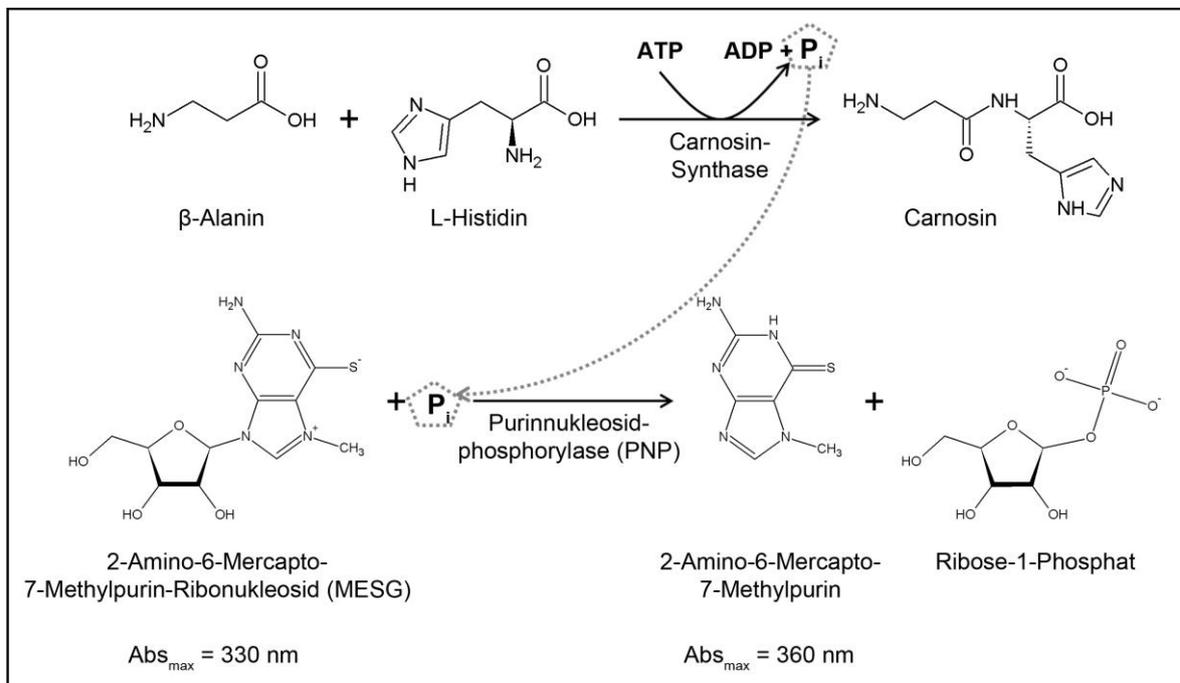


Abbildung 5.16: Schematische Darstellung der gekoppelten Enzymreaktion zur Aktivitätsbestimmung. Die Carnosin-Synthase katalysiert die Reaktion von β -Alanin und L-Histidin zu Carnosin, wobei ATP zu ADP + P_i hydrolysiert wird. Das dabei freigesetzte P_i wird anschließend von der Purinnukleosidphosphorylase (PNP) als Substrat verwendet. Als zweites Substrat dient der PNP dabei 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin-Ribonukleosid (MESG), woraus 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin und Ribose-1-Phosphat entsteht. Die Detektion erfolgt durch die Messung der Absorption bei 360 nm, da die Abspaltung der Ribose von MESG mit einer Änderung des Absorptionsmaximums von 330 nm auf 360 nm einhergeht.

5.2.3 Aktivitätsbestimmung

Für die in Abbildung 5.17 dargestellte Aktivitätsbestimmung wurden jeweils gleiche Mengen Carnosin-Synthase (0,3 μg) und dieselbe Konzentration (5 mM) der Substrate β -Alanin, L-Histidin und ATP eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde hitzeinaktivierte Carnosin-Synthase verwendet. In weiteren Kontrollansätzen wurde je eines der drei Substrate nicht zugesetzt. Die Bestandteile der gekoppelten Reaktion der PNP wurden nicht variiert (0,2 mM MESG und 0,05 U ($\mu\text{mol}/\text{min}$) PNP). Um einen möglichst zeitgleichen Start der Reaktionen zu gewährleisten, wurde die Carnosin-Synthase jeweils in die Vertiefungen einer

Mikrotiterplatte (384-well) pipettiert und anschließend der vorinkubierte Reaktionsansatz zugegeben. Wie in Abbildung 5.17 zu sehen ist, findet nur dann eine kontinuierliche Zunahme der Absorption statt, wenn alle drei Substrate und aktive Carnosin-Synthase im Reaktionsgemisch vorhanden sind. In allen Kontrollansätzen kann über den gesamten Messzeitraum keine starke Absorptionsänderung detektiert werden. Der Unterschied der Absorption zwischen den Kontrollproben mit und ohne ATP ist dadurch zu erklären, dass ATP nicht sehr stabil ist und teilweise in ADP und P_i zerfällt. Um den Gehalt an P_i zu minimieren, wurde die ATP-Lösung jeweils vor dem Experiment frisch angesetzt. Da das Reaktionsgemisch vor Zugabe der Carnosin-Synthase vorinkubiert wird, spielt die Hintergrundabsorption für die weiteren Aktivitätsbestimmungen keine Rolle, da das freie P_i bereits von der PNP umgesetzt wurde und es sich somit nicht in der Steigung der Kurven widerspiegelt.

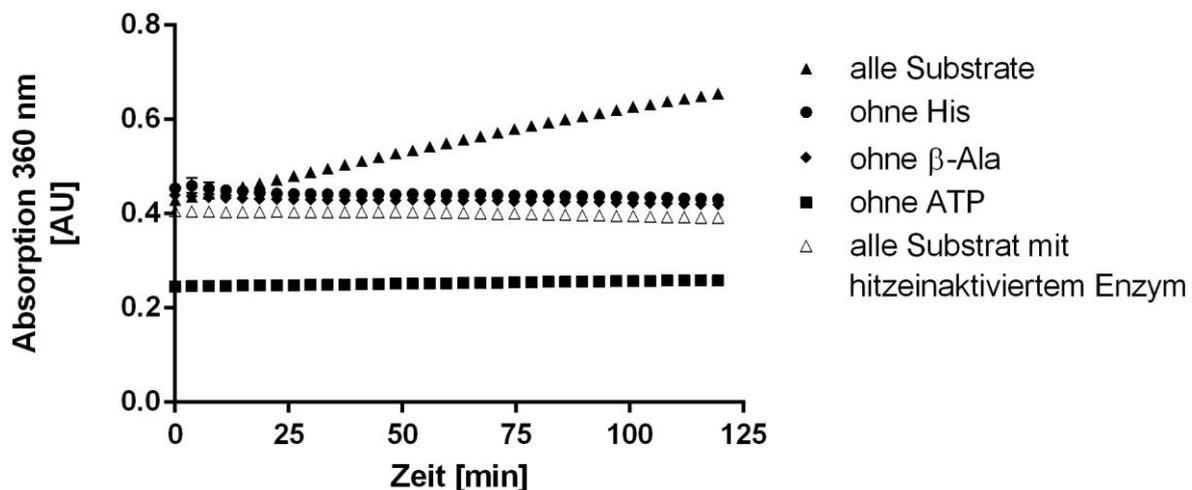


Abbildung 5.17: Aktivitätsbestimmung der Carnosin-Synthase.

Für die Aktivitätsbestimmung wurden je Reaktion 0,3 µg Carnosin-Synthase und je 5 mM der Substrate β-Alanin, L-Histidin und ATP eingesetzt, wobei teilweise auf jeweils eines der Substrate verzichtet wurde. Für einen Kontrollansatz wurde die Carnosin-Synthase zuvor hitzeinaktiviert (10 min 99°C). Die Bestandteile der gekoppelten Reaktion blieben unverändert (0,2 mM MESG und 0,05 U (µmol/min) PNP). Die Reaktionen liefen in einem Endvolumen von 50 µl in der Vertiefung einer Mikrotiterplatte (384-well) ab. Die Carnosin-Synthase wurde zunächst in die Vertiefung pipettiert und die Reaktionen durch Zugabe des vorinkubierten Reaktionsansatzes (15 min RT) gestartet. Gemessen wurde die Absorption bei 360 nm über einen Zeitraum von 2 h bei RT. Dargestellt sind die Mittelwerte (± SD) von einem in Triplikaten durchgeführten Versuch. ▲ alle Substrate, ● ohne Histidin, ◆ ohne β-Alanin, ■ ohne ATP, △ alle Substrate mit hitzeinaktiviertem Enzym.

5.2.4 Linearitätsnachweis und spezifische Enzymaktivität

Nachdem gezeigt wurde, dass die Reaktion der Carnosin-Synthase nur abläuft, wenn alle drei Substrate vorhanden sind, sollte nun untersucht werden, ob ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption bei 360 nm und der Menge der eingesetzten Carnosin-Synthase besteht. Hierfür wurden unterschiedliche Mengen (0 µg, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg, 0,4 µg, 0,5 µg, 0,6 µg, 0,7 µg und 1 µg) der Carnosin-Synthase in das Reaktionsgemisch gegeben und die Absorption bei 360 nm über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen.

Ein Teil der Ergebnisse ist in Abbildung 5.18 A dargestellt. Die Steigungen der Kurven nehmen mit zunehmender Menge an Carnosin-Synthase zu. Die Kurven der Reaktionen mit größerer Menge Carnosin-Synthase erreichen früher das Plateau und flachen ab, als die der Reaktionen mit weniger Carnosin-Synthase. In den Kontrollreaktionen (ohne bzw. mit hitzeinaktivierter Carnosin-Synthase) ist nahezu keine Absorptionzunahme zu erkennen. Da die Absorptionswerte der inaktiven Kontrolle leicht höher sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Proteinlösung selbst bei 360 nm absorbiert. Für zukünftige Messungen wurde daher allen Kontrollreaktionen und Reaktionen mit Phosphatstandards die entsprechende Menge hitzeinaktiviertes Enzym zugesetzt.

Abbildung 5.18 B zeigt einen Ausschnitt der Ergebnisse aus Abbildung 5.18 A, wobei nur der lineare Reaktionsbereich dargestellt ist. Um eine lineare Korrelation zwischen Absorption und Enzymmenge zu zeigen, wurden die Steigungen (6,6 - 25 min) in einem Diagramm gegen die Enzymmenge aufgetragen (Abbildung 5.18 C). Wie zu erkennen ist, besteht die Linearität auch noch bei höheren Enzymkonzentrationen und der Korrelationskoeffizient beträgt 0,99. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich eine Reaktionsgeschwindigkeit von $9,865 \Delta\text{mAU min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$. Für alle folgenden Aktivitätsbestimmungen wurden 0,3 µg Carnosin-Synthase je Reaktion eingesetzt.

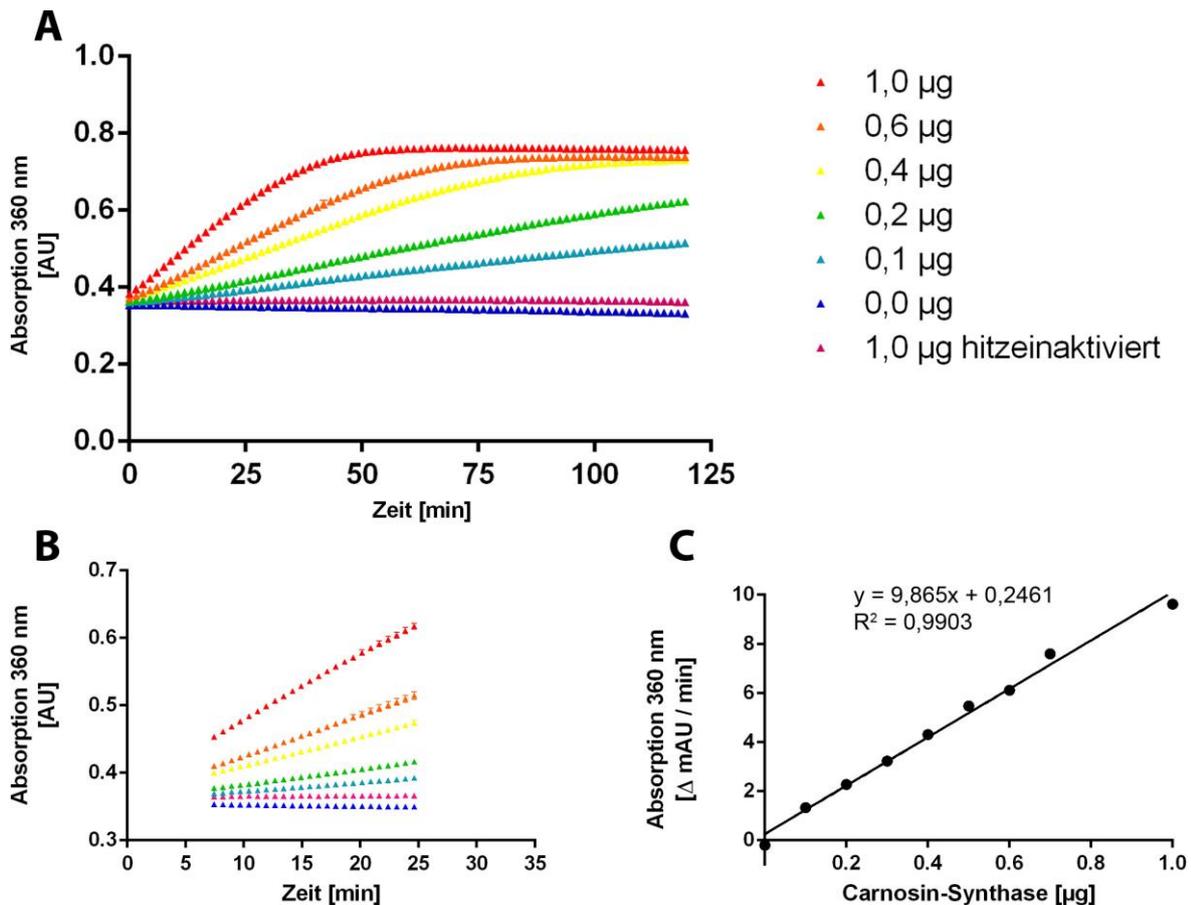


Abbildung 5.18: Linearitätsnachweis der gekoppelten Enzymaktivitätsbestimmung.

In den Enzymreaktionen wurden unterschiedliche Mengen (0 µg, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg, 0,4 µg, 0,5 µg, 0,6 µg, 0,7 µg und 1 µg) an Carnosin-Synthase eingesetzt und die Absorption bei 360 nm über 2 h bei RT gemessen. In den Kontrollansatz wurde 1 µg hitzeinaktiviertes Enzym (10 min 99 °C) zugegeben. (A) Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) der Absorptionsmessung von einem im Triplikat durchgeführten Versuch. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Messergebnisse der Reaktionsansätze mit 0,3 µg, 0,5 µg und 0,7 µg Carnosin-Synthase nicht gezeigt. (B) Ausschnitt aus dem linearen Abschnitt (6,6 - 25 min) der Messung aus (A), der zur Berechnung der Steigung verwendet wurde. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Messergebnisse der Reaktionsansätze mit 0,3 µg, 0,5 µg und 0,7 µg Carnosin-Synthase nicht gezeigt. ▲ 1,0 µg, ▲ 0,6 µg, ▲ 0,4 µg, ▲ 0,2 µg, ▲ 0,1 µg, ▲ 0 µg, ▲ 1,0 µg hitzeinaktiviert. (C) Dargestellt ist die Reaktionsgeschwindigkeit (Δ mAU $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) als Änderung der Absorption pro Minute (6,6 - 25 min), die aus (B) ermittelt wurden, in Abhängigkeit von der Menge an eingesetzter Carnosin-Synthase.

Werden definierte Mengen eines Phosphat-Standards anstelle aktiver Carnosin-Synthase in den Reaktionsansatz gegeben, kann über die gemessene Absorption mit Hilfe einer Kalibriergeraden auf die Phosphatkonzentration zurückgeschlossen werden. Wie in Abbildung 5.19 A dargestellt, ist dieser Zusammenhang bis zur höchsten verwendeten Konzentration von 5 nmol Phosphat im Reaktionsansatz linear (Korrelationskoeffizient = 0,99). Dadurch kann die Menge an verbrauchtem ATP in einer Enzymreaktion ermittelt und somit die spezifische Enzymaktivität der

Carnosin-Synthase berechnet werden. Die Reaktionen des Phosphatstandards wurden bei jeder Aktivitätsbestimmung auf derselben Mikrotiterplatte vermessen.

In Abbildung 5.19 B ist die Reaktionsgeschwindigkeit (nmol/min) in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Carnosin-Synthase dargestellt. Es handelt sich dabei um die Messwerte aus Abbildung 5.18, die mithilfe des Phosphatstandards in die Reaktionsgeschwindigkeit (nmol/min) umgerechnet und gegen die Enzymkonzentration aufgetragen wurden. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich eine spezifische Aktivität von $\sim 150 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. In weiteren Aktivitätsbestimmungen verschiedener Enzympräparationen wurden spezifische Aktivitäten von $\sim 70\text{-}550 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ bestimmt (Daten nicht gezeigt).

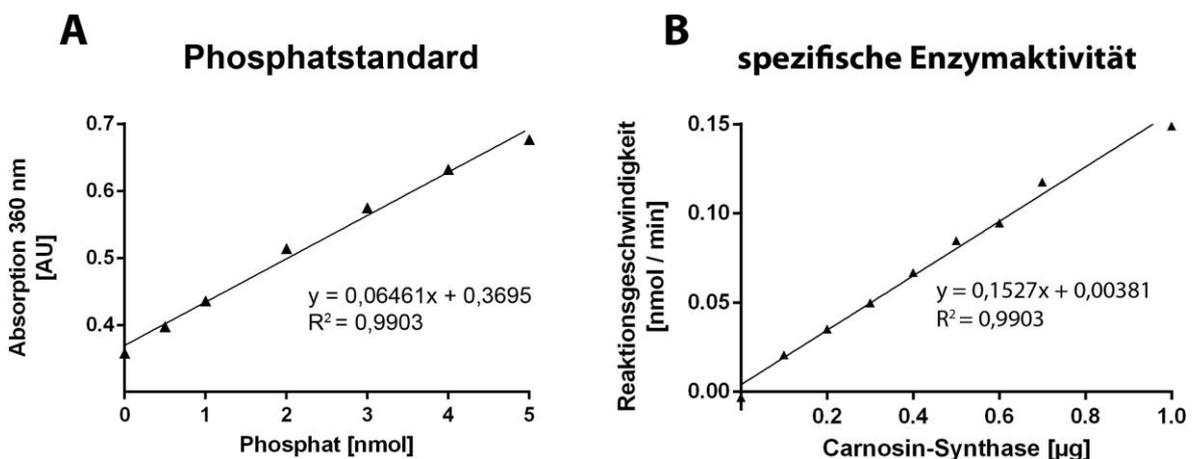


Abbildung 5.19: Berechnung der spezifischen Enzymaktivität.

(A) Anstelle der Carnosin-Synthase wurden definierte Mengen Phosphat (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5 nmol) zu der Enzymreaktion gegeben, die Absorption bei 360 nm gemessen und die Messwerte gegen die Phosphatmenge aufgetragen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines im Triplikat durchgeführten Versuchs. (B) Die Änderung der Absorption pro Zeiteinheit bei verschiedenen Mengen an Carnosin-Synthase aus Abbildung 5.18 wurde mithilfe der in (A) gezeigten Geradengleichung in die Reaktionsgeschwindigkeit (nmol Phosphat / min) umgerechnet und gegen die Menge an Carnosin-Synthase aufgetragen. Die Steigung der Geraden entspricht der spezifischen Enzymaktivität ($\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) und wurde in einem im Triplikat durchgeführten Versuch ermittelt.

Da sich die spezifische Aktivität auf die absolute Enzymmenge bezieht, hängt dieser Wert stark von der Genauigkeit der Proteinbestimmung und der Reinheit der Enzympräparation ab. Aber auch die Dauer der Lagerung spielt eine Rolle, da Enzyme dabei ihre Aktivität verlieren können. Die großen Unterschiede der spezifischen Aktivität in den unterschiedlichen Enzympräparationen können

demzufolge dadurch erklärt werden, dass der Anteil an aktivem Enzym in der Proteinlösung schwankt.

Eine weitere Kenngröße für eine enzymatische Reaktion ist die Michaelis-Menten-Konstante (K_m -Wert), die der Substratkonzentration bei halb-maximaler Reaktionsgeschwindigkeit entspricht. Diese ist für jedes Substrat einzeln zu ermitteln, ist jedoch unabhängig von dem Anteil an aktivem Enzym in der Präparation.

5.2.5 K_m -Wertbestimmung

Für die K_m -Wert-Bestimmung der Carnosin-Synthase für die drei Substrate β -Alanin, L-Histidin und ATP wurde die Konzentration von nur jeweils einem Substrat in der Enzymreaktion variiert und die jeweilige Enzymaktivität bestimmt. Die anderen beiden Substrate lagen in der maximalen Konzentration von 5 mM vor. Die Steigungen der einzelnen Kurven wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen, sodass für jedes Substrat eine Sättigungskurve entsteht. Die K_m -Wert-Bestimmung wurde mit zwei verschiedenen Enzympräparationen durchgeführt.

In Abbildung 5.20 sind die Ergebnisse dieser beiden Messungen dargestellt. Nach nicht-linearer Regression der Daten wurden für jedes Substrat der K_m -Wert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) ermittelt. Für β -Alanin ergibt sich daraus ein K_m -Wert von $161,30 \pm 30,67 \mu\text{M}$ ($V_{max} = 82,68 \pm 3,75 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), für L-Histidin von $32,31 \pm 6,49 \mu\text{M}$ ($V_{max} = 71,80 \pm 2,49 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) und für ATP von $164,60 \pm 31,43 \mu\text{M}$ ($V_{max} = 77,05 \pm 3,52 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) (Mittelwerte \pm SD, $n = 2$).

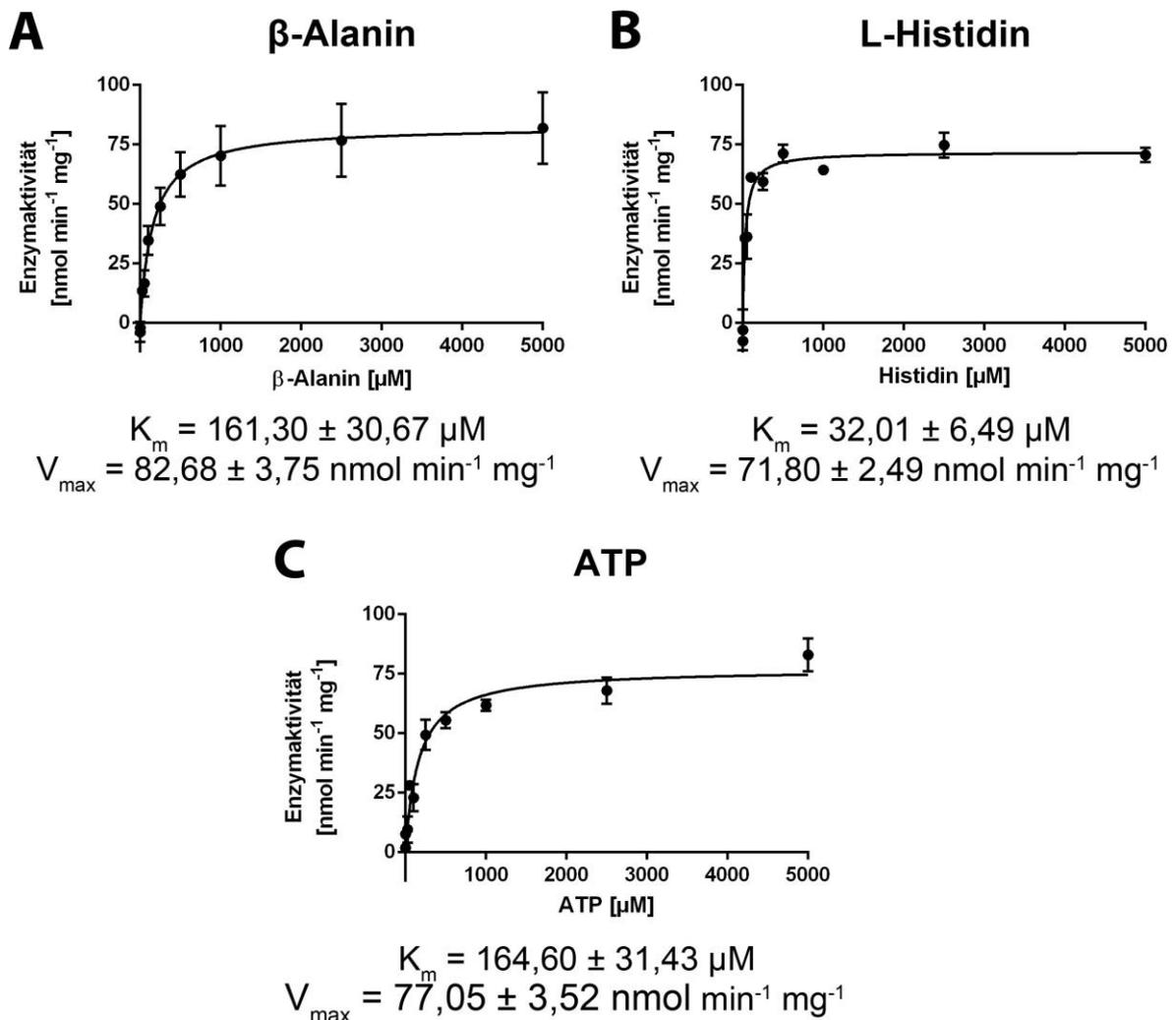


Abbildung 5.20: K_m -Wert-Bestimmung der murinen Carnosin-Synthase.

Es wurden je $0,3 \mu\text{g}$ Carnosin-Synthase in die Enzymreaktionen eingesetzt, wobei die Konzentration von jeweils einem der Substrate β -Alanin (A), L-Histidin (B) und ATP (C) variierte. Die jeweils anderen Substrate lagen mit einer Konzentration von 5 mM vor. Abgetragen ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Carnosin-Synthase gegen die Substratkonzentration von β -Alanin, L-Histidin und ATP. Durch nicht-lineare Regression unter Verwendung der *Software* GraphPad Prism 6 wurde für β -Alanin ein K_m -Wert von $161,30 \pm 30,67 \mu\text{M}$, für L-Histidin von $32,31 \pm 6,49 \mu\text{M}$ und für ATP von $164,60 \pm 31,43 \mu\text{M}$ ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) der K_m -Wert-Bestimmung von zwei unterschiedlichen Enzympräparationen, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

5.2.6 Substratspezifität

Da bereits bekannt ist, dass die Carnosin-Synthase nicht nur Carnosin aus β -Alanin und Histidin, sondern auch Homocarnosin aus γ -Aminobuttersäure (GABA) und Histidin synthetisiert (Kalyankar und Meister, 1959), sollten im Folgenden weitere Substanzen als Substrat der Carnosin-Synthase getestet werden. Eingesetzt wurden Aminosäuren, die physikochemische Ähnlichkeiten zu

β -Alanin, L-Histidin oder GABA aufweisen oder für die bereits in der Literatur beschrieben wurde, dass sie Bestandteile von Neuropeptiden sind (Lähdesmäki, 1987; Ueda et al., 1980).

Für die Aktivitätsbestimmung wurden die verschiedenen Substrate alleine und je zwei Substrate in Kombination für die Enzymreaktion verwendet, wobei sie jeweils in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt wurden. Gemessen wurde die Absorption bei 360 nm über einen Zeitraum von 2 Stunden. In Abbildung 5.21 sind die Ergebnisse dieser Analyse graphisch dargestellt. Deutlich zu erkennen sind drei Reaktionsansätze, in denen eine Änderung der Absorption gemessen werden konnte. Wie erwartet sind β -Alanin bzw. GABA in Kombination mit Histidin Substrate der Carnosin-Synthase, aber auch im Reaktionsansatz mit β -Alanin und Arginin konnte Aktivität der Carnosin-Synthase gemessen werden. Aus der Steigung des linearen Teils der Kurven kann die Aktivität der Carnosin-Synthase für diese Peptide errechnet werden. Wie schon im Graphen zu erkennen ist, ist die Aktivität für die Bildung von Carnosin ($2,13 \Delta\text{mAU min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) höher als für die Bildung von Homocarnosin ($1,42 \Delta\text{mAU min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) und β -Alanyl-L-arginin ($1,41 \Delta\text{mAU min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$). In allen anderen Ansätzen konnte keine Absorptionsänderung detektiert werden. Auf eine Ermittlung der molaren Aktivität wurde hier verzichtet, da bei dieser Messung für jede Substratzusammensetzung eine Phosphatstandardreihe mit denselben Zusammensetzungen gemessen werden müsste.

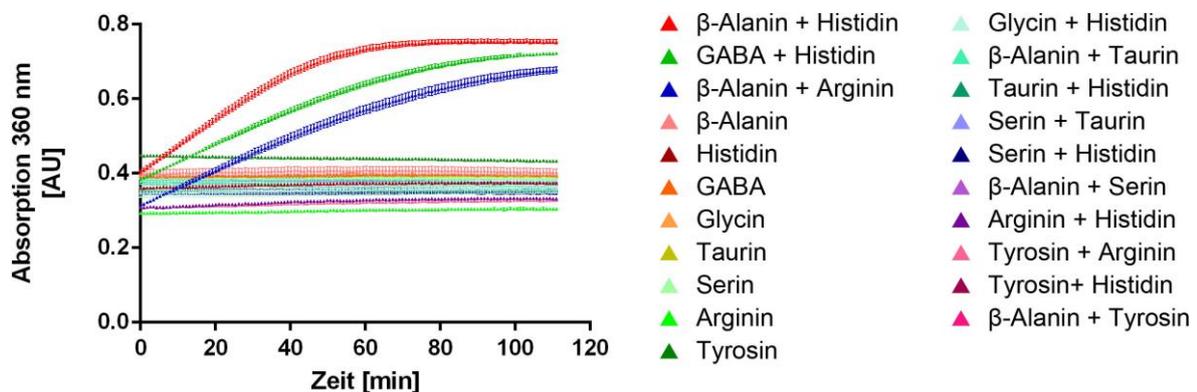


Abbildung 5.21: Substratspezifität der murinen Carnosin-Synthase.

Gemessen wurde die Änderung der Absorption bei 360 nm über eine Dauer von 2 h bei RT in Enzymreaktionen mit unterschiedlichen Substraten. Es wurde je $0,3 \mu\text{g}$ Carnosin-Synthase und je 5 mM der Substrate eingesetzt. Die Substrate β -Alanin, Histidin, GABA, Glycin, Taurin, Serin, Arginin und Tyrosin wurden sowohl alleine als auch in Kombinationen getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) eines im Triplikate durchgeführten Versuches.

6 Diskussion

Auch nach über 100 Jahren der Forschung zur Funktion des Dipeptids Carnosin konnte seine physiologische Funktion noch nicht endgültig geklärt werden. Da aber vor kurzem das Gen für das synthetisierende Enzym, die Carnosin-Synthase, identifiziert wurde (Drozak et al., 2010), sollte in der vorliegenden Arbeit das murine Enzym weiter charakterisiert werden, um auf diesem Wege mehr über die endogenen Aufgaben von Carnosin herausfinden zu können.

6.1 Expression der Carnosin-Synthase im Mausgewebe

6.1.1 Detektion von Carnosin-Synthase und Carnosin

Die bisherigen Analysen zur Expression der Carnosin-Synthase wurden hauptsächlich mittels radioaktiver Messung der Carnosin-Synthase-Aktivität in verschiedenen Gewebepreparationen durchgeführt (Bauer et al., 1982; Harding et al., 1976; Hoffmann et al., 1996; Ng et al., 1977). 1987 wurden erstmals Antikörper gegen die Carnosin-Synthase (Kaninchen) hergestellt (Margolis et al., 1987), allerdings konnten damit lediglich an Fröschen immunhistochemische Analysen erfolgreich durchgeführt werden (Crowe und Pixley, 1991). Für immunbiochemische Analysen wie die Western Blot-Methode waren diese Antikörper scheinbar ungeeignet (Crowe und Pixley, 1991; De Marchis et al., 2000). Die für die Herstellung der Antikörper aus Kaninchenmuskel gereinigte Carnosin-Synthase wies dabei eine Aktivität von $\sim 8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ auf (Margolis et al., 1987). Im Vergleich mit der Aktivität des hier gereinigten murinen Enzyms ($70\text{-}550 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) ist diese relativ gering, was auf eine niedrigere (50-fach) Reinheit der Präparation hinweist. Auch wenn es sich um Enzyme verschiedener Spezies handelt und sich somit die spezifischen Aktivitäten unterscheiden können, so zeigten doch die Carnosin-Synthasen aus Maus, Mensch und Huhn spezifische Aktivitäten in derselben Größenordnung. Zudem fehlte damals ein *Carns1-knock-out*-Modell als Negativkontrolle, um die immunreaktive Spezifität zu zeigen.

In den hier dargestellten Western Blot-Analysen an Mausgewebe (Abbildung 5.1) mit Antikörpern gegen die murine Carnosin-Synthase konnte erstmals gezeigt werden, in welchen Organen die Carnosin-Synthase lokalisiert ist. Aus dem direkten Vergleich von *Carns1-knock-out*- und Wildtyp-Geweben geht hervor, dass es sich bei dem detektierten Signal um ein spezifisches Signal der Carnosin-Synthase handelt. Des Weiteren entspricht das darstellbare Protein mit einer Größe von ~100 kDa in etwa dem errechneten Molekulargewicht eines Carnosin-Synthase-Monomers (je nach Transkriptvariante ~89-102 kDa). Da die Antikörper gegen den C-terminalen Teil (Exon 10) der murinen Carnosin-Synthase gerichtet sind, ist zu erwarten, dass damit alle drei Transkriptvarianten detektiert werden können.

In den Western Blot-Analysen konnte das Enzym in Riechepithel, Riechhirn, Stammhirn, Kleinhirn, Rückenmark, Skelettmuskel und Herz detektiert werden, wobei es sich ausschließlich um erregbares Gewebe handelt. In Vorderhirn, Leber, Niere, Milz, Thymus und Lunge konnte keine Carnosin-Synthase detektiert werden. Im Riechepithel und Riechhirn waren die Signale am stärksten, wobei die Konzentration der Carnosin-Synthase im Riechepithel im Vergleich zum Riechhirn etwa fünfmal höher ist. Die nächst höhere Carnosin-Synthase-Konzentration konnte im Skelettmuskel detektiert werden, wobei sie im Vergleich zu Riechepithel und Riechhirn deutlich geringer ist. Diese Ergebnisse decken sich mit den früheren Carnosin-Synthase-Untersuchungen, bei der die höchste Aktivität der Carnosin-Synthase im Riechepithel ($495 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und eine niedrigere im Riechhirn ($92 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und Skelettmuskel ($37 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) gemessen wurde (Harding et al., 1976). Eine Schlussfolgerung, die daraus gezogen werden kann, ist, dass die Unterschiede in den gemessenen Enzymaktivitäten der verschiedenen Gewebe hauptsächlich auf die Enzymmenge zurückzuführen sind. In Leber, Niere, Lunge und Milz konnte damals keine Aktivität gemessen werden oder sie war kleiner als $5 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Stammhirn, Rückenmark und Thymus wurden von Harding et al. nicht untersucht. In Kleinhirn ($6,6 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und Herz ($0,8 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) wurden niedrigere Aktivitäten gemessen als im Cortex ($11,4 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Dies steht aber nicht im Gegensatz zu den hier dargestellten Western Blot-Analysen, bei denen die Signale in Kleinhirn und Herz stärker sind

als im Vorderhirn, da hierfür nicht nur der Cortex, sondern das gesamte Vorderhirn (ohne Riechhirn) verwendet wurde. Falls die Carnosin-Synthase nur im Cortex lokalisiert ist, ist es möglich, dass sie dadurch im Vorderhirnhomogenat unter die Nachweisgrenze verdünnt wurde.

Die Lokalisation von Carnosin in Rezeptorneuronen und auch deren Axone wurde bereits durch immunhistochemische Methoden in Ratten und Menschen gezeigt (Sakai et al., 1987, 1990). Daher wurde postuliert, dass Carnosin als Neurotransmitter fungiert. Wie bereits oben erwähnt, konnte auch eine Carnosin-Synthase-Aktivität im Riechepithel nachgewiesen werden. Die Vermutung lag nahe, dass das Enzym im Speziellen in den Rezeptorneuronen lokalisiert ist, da dort auch Carnosin detektiert werden konnte.

In den hier durchgeführten Untersuchungen (Abbildung 5.3) konnte nun mittels konfokaler Laserscanmikroskopie gezeigt werden, dass die Carnosin-Synthase und das Dipeptid Carnosin im Riechepithel in denselben Zellen lokalisiert sind. Aufgrund der Morphologie der Zellen, die Signale für Carnosin und Carnosin-Synthase zeigen, kann geschlossen werden, dass es sich hierbei um Rezeptorneurone handelt, da nur diese Zellen einen zur Epitheloberfläche gerichteten Ausläufer haben. Die Stützzellen, deren Zellkörper in der DAPI-Färbung gut zu sehen sind, liegen am oberen Rand des Epithels und zeigen weder ein Carnosin- noch ein Carnosin-Synthase-Signal. Da allerdings auch Zellen eine Antigenfärbung aufweisen, bei denen keine distalen Dendriten zu sehen sind, kann es sich dabei entweder um Rezeptorneurone handeln, deren Dendriten nicht in der Fokusebene liegen, oder aber um Basalzellen. Da einige dieser Zellen eher in der unteren Schicht des Epithels liegen, kann vermutet werden, dass es sich dabei tatsächlich um Basalzellen handelt. Des Weiteren können sich aus den Basalzellen neue Rezeptorneurone entwickeln, weshalb es nicht verwundert, dass sie bereits Carnosin-Synthase und Carnosin bilden. Eventuell handelt es sich dabei um genau die Basalzellen, die schon teilweise zu Rezeptorneuronen differenziert sind. Dies passt auch zu der Beobachtung, dass die Signale für die Carnosin-Synthase und Carnosin in den Zellen mit distalem Dendrit stärker sind als in denen ohne. Dies könnte bedeuten, dass erst die

vollständig differenzierten Rezeptorneurone die höchste Konzentration von Carnosin und Carnosin-Synthase aufweisen.

Sowohl das Peptid als auch das Enzym konnten hier allerdings nicht nur in den Zellkörpern und Dendriten der Rezeptorneurone nachgewiesen werden. Starke immunhistochemische Signale von Carnosin, aber auch der Carnosin-Synthase wurden in den Nervenbündeln des Riechepithels detektiert (Abbildung 5.4). Die OMP-Färbung weist darauf hin, dass es sich dabei um die Axonbündel der Riechsinneszellen handelt, da OMP ein spezifischer Marker für Rezeptorneurone ist. Zusammen mit den Aufnahmen der Immunfärbung des Riechhirns, bei denen die Carnosin-Synthase nur am äußersten Rand der *Glomeruli olfactorii*-Schicht detektiert werden konnte, geben diese Ergebnisse erste Hinweise darauf, dass die Carnosin-Synthase vielleicht selbst gar nicht im Riechhirn exprimiert wird, sondern lediglich axonal bis zu den synaptischen Endigungen im Riechhirn transportiert wird.

Die früheren Bestimmungen der Carnosin-Konzentration im Gewebe wurden bislang entweder in quergestreifter Muskulatur oder im Nervensystem von Säugetieren durchgeführt, nicht aber mit derselben Methode in verschiedenen Organen, sodass sich die Werte nur schlecht vergleichen lassen. Im Skelettmuskel von Ratten wurden Konzentrationen von ~ 3 nmol/mg (Davey, 1960) und im Riechepithel bzw. Riechhirn von Mäusen von $\sim 2,5$ nmol/mg bzw. $\sim 2,2$ nmol/mg gefunden (Margolis, 1974). Die Ergebnisse der DC (Abbildung 5.6) zeigen zum einen, dass bei der hier verwendeten Detektionsmethode tatsächlich das Dipeptid Carnosin erfasst wurde, da es nicht im *Carns1-knock-out*-Gewebe detektiert werden konnte und die Laufhöhe auf der DC mit der des Carnosin-Standards übereinstimmt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Carnosin mit der höchsten Konzentration von $2,49 \pm 0,22$ nmol/mg (Mittelwert \pm SD, $n = 3$) im Skelettmuskel vorkommt. Im Riechepithel konnte eine Konzentration von $1,52$ nmol/mg ($n = 1$) berechnet werden und im Riechhirn von $1,23 \pm 0,04$ nmol/mg (Mittelwert \pm SD, $n = 3$). In den anderen Geweben, die getestet wurden, konnte Carnosin nicht detektiert werden. Dazu gehörten Vorderhirn, Klein- und Stammhirn, Herz, Leber und Niere. Diese Ergebnisse stimmen in ihrer Tendenz mit den bisherigen Untersuchungen überein, im Skelettmuskel liegt die höchste

Carnosin-Konzentration vor, etwas geringer ist sie in Riechepithel und Riechhirn. Des Weiteren können die hier berechneten Konzentrationen direkt miteinander verglichen werden. Insgesamt liegen die Werte allerdings unter denen früherer Konzentrationsbestimmungen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass es sich damals bei der Messung im Skelettmuskel um Rattengewebe gehandelt hat und bei der Untersuchung der Riechbahn eine andere Detektionsmethode (Ionenaustauschchromatographie) verwendet wurde.

6.1.2 Nachweis der Carnosin-Synthase-mRNA mit ihren verschiedenen Transkriptvarianten

Da das Gen für die Carnosin-Synthase erst 2010 identifiziert wurde, gab es bislang noch keine Untersuchungen zur Expression der Carnosin-Synthase auf Transkriptebene. In ersten *in situ* Hybridisierungs-Analysen wurde hier zunächst die Transkription im Riechepithel und Riechhirn mit DIG-markierten RNA-Sonden untersucht. Die Carnosin-Synthase-mRNA war nur im Riechepithel der Wildtyp-Maus zu detektieren, nicht hingegen im Riechhirn (Abbildung 5.7). Dabei ist anzumerken, dass auch kein Signal in der äußeren Schicht des Riechhirns, der *Glomeruli olfactorii*-Schicht zu erkennen ist. Dies ist, neben den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenzmikroskopie, ein weiterer Hinweis darauf, dass die Carnosin-Synthase nur in den Rezeptorneuronen exprimiert ist und das Enzym axonal bis zu den synaptischen Endigungen im Riechhirn transportiert wird.

In Northern Blot-Analysen an Rückenmark-, Riechhirn- und Riechepithel-RNA (Abbildung 5.8) konnten die Ergebnisse aus der *in situ* Hybridisierung bestätigt werden. Die Carnosin-Synthase-RNA ist mittels Northern Blot-Analyse nur im Riechepithel detektierbar, nicht aber in Riechhirn und Rückenmark. Da in den Proben des *Carns1-knock-out*-Gewebes kein Signal zu sehen ist und in den *Carns1*-heterozygot-Gewebeproben alle Signale etwa halb so stark erscheinen wie in den Proben des Wildtyp-Gewebes, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um spezifische Signale der Carnosin-Synthase-RNA handelt. Auch dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Carnosin-Synthase nicht im Riechhirn, sondern nur im Riechepithel exprimiert wird.

Da die hnRNA von anderen Zielgenen normalerweise bei Northern Blot-Analysen nicht so deutlich zu detektieren ist, scheint die hnRNA des Carns1-Gens im Kern stabilisiert zu werden. Bei Untersuchungen, in denen die Prozessierung aller hnRNA zur reifen mRNA gehemmt wurde, zeigte sich, dass hnRNA im Kern akkumuliert, aber zu einem späteren Zeitpunkt weiter prozessiert werden kann und zunächst nicht abgebaut wird (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Hett und West, 2014). Dies könnte in Bezug auf die Carns1-hnRNA bedeuten, dass hier eventuell die Prozessierung spezifisch gehemmt ist. Ein möglicher Mechanismus dafür wäre die Bindung der hnRNA an die lncRNA, da diese große Bereiche enthält, die komplementär zur hnRNA sind.

Die für die *in situ* Hybridisierung und Northern Blot-Analysen verwendete Antisense-Sonde ist komplementär zu den Exons 4-8 der Carns1-mRNA. Da diese Sequenz auch in der mRNA der Transkriptvariante X1 enthalten ist, kann die Sonde auch diese Transkriptvariante in den hier durchgeführten Untersuchungen detektieren. Die mRNA der Transkriptvariante X2 weist zwar erst ab Exon 5 dieselbe Sequenz wie die anderen Transkriptvarianten auf, der hierzu komplementäre Abschnitt der Sonde (716 bp von 757 bp) sollte aber ausreichen, sodass diese Transkriptvariante von der Sonde ebenfalls detektiert wird.

Die quantitative *real-time* PCR-Analyse der einzelnen Transkriptvarianten zeigte, dass im Riechepithel sowohl die normale Carnosin-Synthase exprimiert ist, als auch die Transkriptvariante X1. Es wäre zu erwarten, dass beide mRNAs in der Northern Blot-Analyse des Riechepithels detektiert werden. Die mRNA der normalen Variante besteht aus 3968 bp und die der Transkriptvariante X1 aus 3685 bp. Es könnte also sein, dass die kleinere mRNA der Transkriptvariante X1 dem Signal unterhalb der 28S rRNA entspricht und die größere mRNA der normalen Variante von der 28S rRNA etwas nach oben verdrängt wird.

Bei der weiteren Auswertung der quantitativen *real-time*-PCR-Analyse aus Abbildung 5.9 ist nochmal zu erwähnen, dass die verwendeten Oligonukleotide (#5+6) spezifisch für die mRNA aller Transkriptvarianten der murinen Carnosin-Synthase sind. Erst in den darauffolgenden Analysen (Abbildung 5.11) wurden Oligonukleotide verwendet, die für die einzelnen Transkriptvarianten bzw. die

lncRNA spezifisch sind. Ohne Unterscheidung zwischen den Transkriptvarianten zeigt die Analyse die stärkste mRNA-Expression der Carnosin-Synthase im Riechepithel. In keinem anderen Gewebe konnte eine so starke Expression nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Rückenmark, in dem die zweitstärkste Expression detektiert wurde, ist die Carnosin-Synthase im Riechepithel 15-fach stärker exprimiert. Eine ähnlich starke Expression wie im Rückenmark ist auch im Stammhirn zu finden. In Vorderhirn, Kleinhirn, Herz und Thymus ist die Expression deutlich geringer. Noch geringer ist sie in Skelettmuskel, Milz und Riechhirn und in Leber, Niere und Lunge konnte so gut wie keine Expression nachgewiesen werden.

Die hohe Expression der Carnosin-Synthase im Riechepithel auf RNA- und Proteinebene und im Gegensatz dazu die geringe Carnosin-Konzentration im Vergleich zum Muskel, weist darauf hin, dass im Riechepithel ein extrem hoher Umsatz an Carnosin stattfindet. Dies könnte wiederum bedeuten, dass die Aufgabe des Carnosins in der Riechbahn einen sehr schnellen Abbau erfordert, wie es zum Beispiel bei sezernierten Peptiden der Fall wäre. Für eine Pufferwirkung des Carnosins im Muskel wäre hingegen kein hoher Umsatz notwendig, sondern eine Anreicherung förderlich.

Betrachtet man nun die quantitativen *real-time*-Analysen der einzelnen Transkriptvarianten der Carnosin-Synthase so kann man zusammenfassend sagen, dass die normale Transkriptvariante und die Transkriptvariante X1 am stärksten im Riechepithel exprimiert sind. Für diese beiden Transkriptvarianten konnte im Skelettmuskel keine Expression nachgewiesen werden. Zur normalen Variante muss allerdings angemerkt werden, dass nur die Ergebnisse des Riechepithels wirklich belastbar sind. In allen anderen Geweben scheint diese mRNA kaum oder nicht vorhanden zu sein, sodass mit den Oligonukleotiden eine der anderen Transkriptvarianten amplifiziert wurde. Die verwendeten Oligonukleotide wurden so gestaltet, dass sie jeweils einen spezifischen Exon-Exon-Übergang überspannen und somit nur ein kleiner Teil komplementär zur mRNA der jeweils anderen Transkriptvarianten ist. Diese kurze Sequenz reicht scheinbar für eine Amplifikation eines falschen PCR-Produkts aus, wenn die mRNA der normalen Variante nicht exprimiert ist. Die normale Variante scheint

also ausschließlich im Riechepithel exprimiert zu sein. Die Transkriptvariante X1 ist außer im Riechepithel auch in anderen Geweben, überwiegend Nervengeweben, wie Vorderhirn, Stammhirn, Rückenmark und Thymus exprimiert.

Ein vollkommen anderes Expressionsmuster ergibt sich bei der Transkriptvariante X2. Diese ist am stärksten im Herz und etwas schwächer auch im Skelettmuskel exprimiert. Sie scheint also spezifisch für Muskelgewebe zu sein, wohingegen die normale Variante und die Transkriptvariante X1 eher im Nervengewebe vorkommt. Für einige andere Gene ist bereits bekannt, dass alternatives Spleißen vom Gewebe abhängig sein kann (Sugnet et al., 2006). Betont werden sollte an dieser Stelle auch, dass keine der drei Transkriptvarianten im Riechhirn exprimiert ist, obwohl die Carnosin-Synthase mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen wurde. Auf diese Besonderheit wird in Abschnitt 6.1.4 gesondert eingegangen.

Außerdem fällt auf, dass im Herz sowohl alle Varianten einzeln (Abbildung 5.11) als auch gemeinsam (Abbildung 5.9) eine höhere Expression zeigen als im Skelettmuskel, wohingegen die Western Blot-Analyse ergab, dass mehr Enzym im Skelettmuskel lokalisiert ist als im Herz. Zwar wurde in früheren Analysen schon gezeigt, dass die Carnosin-Synthase-Aktivität im Herz nur sehr gering ist (0,8 nmol/mg) (Harding et al., 1976), was aber auch durch eine Regulation der Enzymaktivität zum Beispiel durch Inhibitoren oder Phosphorylierung verursacht werden könnte. Hier konnte nun erstmals gezeigt werden, dass die geringe Carnosin-Synthase-Aktivität im Herz tatsächlich auf eine geringe Enzymkonzentration zurückzuführen ist. Es scheint also, als würde die Carnosin-Synthase im Herz sehr schnell wieder abgebaut werden oder, trotz des höheren mRNA-Levels, weniger Protein synthetisiert zu werden.

Unter Berücksichtigung der Expression der unterschiedlichen Transkriptvarianten soll nun die Western Blot-Analyse (Abbildung 5.1) in Bezug auf das Molekulargewicht der Carnosin-Synthase detailliert betrachtet werden. Es fällt dabei auf, dass in allen Gewebeproben die Signale der Carnosin-Synthase auf etwa derselben Höhe liegen. Der geringe Massenunterschied der Carnosin-Synthase im Skelettmuskel kann wie bereits erwähnt durch die Verdrängung der

Carnosin-Synthase im SDS-Gel durch ein im Skelettmuskelgewebekomogenat enthaltenes dominantes Protein mit ähnlichem Molekulargewicht erklärt werden. Der Unterschied im Riechepithel hingegen ist auf die geringere Menge an geladenem Gesamtprotein (Riechepithel 20 µg; anderen Organe 100 µg) zurückzuführen.

Die Auswertung der quantitativen *real-time*-PCR-Analysen ergab allerdings eine Expression der Carnosin-Synthase X2 im Skelettmuskel und Herz, die mit einem errechneten Molekulargewicht von ~89 kDa in der Western Blot-Analyse deutlich tiefer als die Carnosin-Synthase der anderen beiden Transkriptvarianten detektiert werden müsste. Die Höhe der Signale der Western Blot-Analyse könnten in etwa dem Molekulargewicht der Carnosin-Synthase X1 (errechnetes Molekulargewicht: ~94 kDa) entsprechen, deren mRNA mittels quantitativer *real-time* PCR-Analyse in den Geweben detektiert wurde, in denen auch ein Signal in der Western Blot-Analyse zu sehen ist. Da wie bereits zu Beginn erläutert, der verwendete Antikörper gegen den C-terminalen Teil der Carnosin-Synthase gerichtet ist, der bei allen Transkriptvarianten gleich ist, müsste eigentlich auch die Carnosin-Synthase der normalen Variante im Riechepithel und die der Transkriptvariante X2 im Skelettmuskel und Herz erkannt werden. Im Riechepithel wäre somit eine Doppelbande zu erwarten, da der Unterschied im errechneten Molekulargewicht mit ~8 kDa (normale Variante ~102 kDa und Transkriptvariante X1 ~94 kDa) deutlich zu sehen sein müsste. Daher scheinen die Ergebnisse der Western Blot-Analyse und der quantitativen *real-time* PCR-Analysen zunächst widersprüchlich. Potentielle Erklärungsansätze werden im Folgenden ausführlicher diskutiert.

Die Expression der Transkriptvariante X1 ist nach den quantitativen *real-time* PCR-Ergebnissen im Skelettmuskel und Herz im Vergleich zu den anderen Geweben relativ gering, dennoch ist die entsprechende mRNA detektierbar. Es könnte sich bei dem Signal der Western Blot-Analyse also um die Carnosin-Synthase X1 wie in den übrigen Geweben handeln. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass obwohl die mRNA der Transkriptvariante X2 im Skelettmuskel und Herz (relative Expressionswerte: $0,246 \pm 0,076$ und $0,497 \pm 0,124$, Mittelwerte \pm SD) detektiert wurde, nur sehr wenig Protein synthetisiert wird, sodass es in der Western Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden kann. Dasselbe gilt für die

Carnosin-Synthase der normalen Variante im Riechepithel, deren Proteingehalt scheinbar unterhalb der Nachweisgrenze dieser Western Blot-Analyse liegt. Die geringen mRNA-Level der Transkriptvariante X1 in Skelettmuskel und Herz (relativer Expressionswerte: $0,168 \pm 0,062$ und $0,815 \pm 0,055$, Mittelwerte \pm SD) führen im Gegensatz dazu zu einer viel stärkeren Proteinproduktion, sodass in diesen Geweben die Carnosin-Synthase X1 in der Western Blot-Analyse detektiert werden kann.

Die $2^{(-\Delta Ct)}$ -Werte der verschiedenen Oligonukleotidpaare können nicht miteinander verglichen werden, da die Oligonukleotide unterschiedlich lang sind und auch das amplifizierte PCR-Produkt verschiedene Größen hat. Die Signale der verschiedenen quantitativen *real-time* PCR-Analysen lassen sich daher, im Gegensatz zu denen aus den verschiedenen Geweben einer Analyse, nicht quantitativ miteinander vergleichen. Dies könnte die Diskrepanz zwischen Western Blot-Analyse und quantitativer *real-time* PCR-Analyse erklären.

Hinzukommt, dass die Stabilität einer mRNA, bzw. wie effizient sie abgelesen wird und wieviel Protein daraus entsteht, von Gewebe zu Gewebe verschieden sein kann. Aber auch die Stabilität des Proteins kann durch den verkürzten oder veränderten N-Terminus variieren. Der Proteingehalt der Carnosin-Synthasen, der auf die normale bzw. die Transkriptvariante X2 zurückzuführen ist, liegt offenbar unter der Nachweisgrenze dieser Western Blot-Analyse.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der quantitativen *real-time*-PCR-Analyse für die lncRNA fällt auf, dass sie in denselben Geweben wie die Transkriptvariante X2 stark exprimiert ist, in Herz und Skelettmuskel. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die Funktion dieser lncRNA sein, über die bislang noch nichts bekannt ist. Sie könnte die Produktion der Carnosin-Synthase regulieren, und zwar dahingehend, dass zum Beispiel die Reifung der hnRNA zur mRNA gehemmt wird, da sie lange komplementäre Sequenzen zur Carnosin-Synthase-hnRNA aufweist. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass die lncRNA an die Carns1-X2-hnRNA bindet und somit die Reifung zur mRNA durch das Spleißosom verhindert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Translation der Transkriptvariante X2 durch die lncRNA gehemmt wird und somit der Carnosin-Synthase-Gehalt reguliert wird. Dies könnte

ähnlich wie bei siRNAs durch eine Bindung der lncRNA an die Carnosin-Synthase-mRNA geschehen.

6.1.3 Modell zur Regulation der Carnosin-Konzentration

Das aktive Zentrum der Carnosin-Synthase wird aufgrund der Lokalisation der ATP-Grasp-Domäne im C-terminalen Teil des Enzyms vermutet (Drozak et al., 2010). Der N-terminale Teil weist hingegen mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen auf, wodurch spekuliert werden könnte, dass dieser regulatorische Funktion hat. Da sich der Unterschied zwischen den Transkriptvarianten auf den N-terminalen Teil der Carnosin-Synthase beschränkt und dieser bei der Transkriptvariante X2 am stärksten verkürzt ist, könnte es sein, dass diese Transkriptvariante einem anderen Regulationsmechanismus unterliegt. Erweiternd wäre auch denkbar, dass es im Skelettmuskel keiner so starken Regulation der Carnosin-Synthase bedarf, wie im Nervengewebe, da ein erhöhter Carnosin-Gehalt im Skelettmuskel offenbar keine negative Wirkung hat (Boldyrev et al., 2013). Für einige andere Proteine konnte bereits gezeigt werden, dass alternatives Spleißen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben kann (Smith et al., 1989). Ein Beispiel, bei dem nachgewiesen wurde, dass dadurch die Aktivität eines Enzyms variieren kann, ist die Pyruvatkinase (Noguchi et al., 1986).

Ein Modell zur Regulation des Carnosin-Gehalts im Skelettmuskel könnte also wie folgt aussehen. Die Prozessierung der Transkriptvariante X2-mRNA oder auch dessen Translation wird durch die lncRNA im Muskelgewebe reguliert, wodurch nur wenig der Carnosin-Synthase-X2 produziert wird. Diese wird aufgrund ihres veränderten N-Terminus zwar schneller wieder abgebaut, wird aber auch durch den verkürzten N-Terminus in ihrer Aktivität weniger reguliert und kann also effizienter Carnosin synthetisieren. Dies führt zu einem erhöhten Carnosin-Gehalt im Skelettmuskel, obwohl deutlich weniger Carnosin-Synthase im Vergleich zu Riechhirn und Riechepithel vorhanden ist.

6.1.4 Transport der Carnosin-Synthase ins Riechhirn

Aufgrund früherer Ergebnisse wurde zunächst davon ausgegangen, dass Carnosin axonal ins Riechhirn transportiert wird (Margolis und Grillo, 1977). Bei nasaler Verabreichung der radioaktiv-markierten Aminosäuren β -Alanin oder L-Histidin bei Mäusen konnte radioaktives Carnosin, aber nicht β -Alanin oder L-Histidin im Riechhirn nachgewiesen werden. In späteren Versuchen mit chemischer Denervierung der Riechbahn konnte gezeigt werden, dass die Carnosin-Synthase-Aktivität im Riechhirn abnahm. Daraus wurde geschlossen, dass die Carnosin-Synthase in den Rezeptorneuronen lokalisiert ist (Harding et al., 1976), anders als die Carnosinase, deren Aktivität im Riechhirn bei den Untersuchungen nicht abnahm.

Zusammen mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse, der Immunfluoreszenzmikroskopie, der *in situ* Hybridisierung, der Northern Blot- und der quantitativen *real-time*-PCR-Analysen konnte hier gezeigt werden, dass die Carnosin-Synthase nicht im Riechhirn, sondern in den Rezeptorneuronen des Riechepithels exprimiert wird. Sie scheint axonal bis in die synaptischen Endigungen der Rezeptorneurone im Riechhirn transportiert zu werden.

Falls Carnosin als Neurotransmitter oder Neuromodulator fungiert, könnte eine mögliche Begründung für den Transport des synthetisierenden Enzyms sein, dass die Zelle schneller mit der Bildung von Carnosin an den Synapsen vor Ort auf ein Signal reagieren kann. Würde die Carnosin-Synthase im Zellkörper der Rezeptorneurone im Riechepithel verbleiben und nur das Dipeptid entlang des Axons bis zur synaptischen Endigung transportiert werden, würde sich die Zeit, bis die Zelle mit einer Änderung der Carnosin-Menge reagieren kann, um einiges verlängern. Auch bei bekannten Neurotransmittern, wie zum Beispiel Acetylcholin, konnte bereits gezeigt werden, dass das synthetisierende Enzym, die Cholinacetyltransferase, im Zellkörper gebildet und über den langsamen axonalen Transport in die synaptischen Endigungen transportiert wird (Ray et al., 1999).

6.1.5 Altersabhängige Zunahme der Konzentration von Carnosin-Synthase und Carnosin im Gewebe

Eine Bestimmung des Carnosin-Synthase-Gehalts abhängig vom Alter gab es bislang weder in Nagern noch in Menschen, auch nicht durch die Messung der Carnosin-Synthase-Aktivität. Lediglich die Carnosin-Konzentration im Skelettmuskel des Menschen wurde in Abhängigkeit vom Alter magnetresonanzspektroskopisch untersucht (Everaert et al., 2011). Es zeigte sich dabei, dass die Carnosin-Konzentration zwischen 19 und 47 Jahren negativ mit dem Alter korreliert. In einer anschließenden Analyse wurde erweiternd dazu festgestellt, dass die Carnosin-Konzentration bei Männern während der Pubertät (~8 bis ~18 Jahre) zunächst zunimmt, bevor sie mit steigendem Alter wieder abnimmt (Baguet et al., 2012).

In den hier durchgeführten Western Blot-Analysen (Abbildung 5.12) konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der Carnosin-Synthase im Riechhirn von Mäusen nach der Geburt mit dem Alter zunimmt. Dabei ist das Enzym im Riechhirn von neugeborenen Mäusen nicht detektierbar und steigt bis P60 je Altersstufe signifikant an. Die höchste Konzentration an Carnosin-Synthase konnte hierbei in 12 Monate alten Mäusen detektiert werden, allerdings ist der Unterschied zu P60 nicht mehr signifikant. Da zwischen P60 und 12 Monaten bzw. 12 Monaten und 22 Monaten jeweils ein relativ großer Altersunterschied besteht, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das eigentliche Konzentrationsmaximum noch unter oder schon über 12 Monaten liegt.

Die Bestimmung der Carnosin-Konzentration im Riechhirn ergab ähnliche Ergebnisse, wobei der anfängliche Anstieg nur bis zur Altersstufe P20 signifikant ist. Die höchste Konzentration wurde ebenfalls in 12 Monate alten Mäusen gemessen. Auch im Skelettmuskel besteht eine positive Korrelation zwischen der Carnosin-Konzentration und dem Alter bis zu einem Alter von 12 Monaten. Danach nimmt die Konzentration allerdings wieder signifikant ab. Dies konnte im Riechhirn nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Carnosin im jungen Alter eine untergeordnete Rolle spielt. Die Funktion von Carnosin scheint also erst im Laufe der Entwicklung

zum adulten Tier von größerer Bedeutung zu werden. Mögliche Aufgaben des Carnosins diesbezüglich werden im Folgenden dargestellt.

Eine potentielle Bedeutung könnte Carnosin für eine sich ändernde Pheromonwahrnehmung in unterschiedlichen Entwicklungsstufen zugeschrieben werden. Ein Hinweis darauf sind die immunhistochemischen Analysen der Nasenhöhle (Abbildung 5.5) dieser jung adulten Mäuse (drei Monate), die ein starkes Carnosin-Signal in den Rezeptorneuronen des Vomeronasalorgans zeigen. Beim Vomeronasalorgan handelt es sich um einen besonderen Teil des Geruchsorgans, der ebenfalls mit Riechepithel ausgekleidet ist und vornehmlich für die Wahrnehmung von Pheromonen zuständig ist. Bei Säugetieren ist es zum Beispiel für ein ausgeprägtes Fortpflanzungs- und Sozialverhalten unabdingbar. Die Riechsinneszellen des Vomeronasalorgans sind ebenfalls primäre Rezeptorneurone, deren Axone über den Riechnerv bis in die *Glomeruli olfactorii*-Schicht des Riechhirns (Nebenriechkolben, *bulbus olfactorius accessorius*) reicht.

Die Rezeptorproteine der vomeronasalen Neurone sind denen der olfaktorisch sensorischen Neurone nur strukturell sehr ähnlich, sie bestehen alle aus sieben Transmembrandomänen, unterscheiden sich jedoch grundlegend in ihrer Aminosäuresequenz und Signaltransduktion. In den vomeronasalen Neuronen gibt es zwei verschiedene Rezeptorfamilien, die Vomeronasal-1- und Vomeronasal-2-Rezeptoren (V1R und V2R). In den olfaktorisch sensorischen Neuronen sind hauptsächlich die Odorant-Rezeptoren exprimiert. (Dulac, 1997; Hagino-Yamagishi, 2008)

Ein aktuelles Modell geht davon aus, dass die Transduktion bei den Odorant-Rezeptoren über das G_{olf} -Protein und cAMP stattfindet. Bei den Vomeronasal-Rezeptoren spielt hingegen das G_{i2} - (V1R) bzw. das G_o -Protein (V2R) eine Rolle, wodurch die Phospholipase C aktiviert wird und es über mehrere weitere Schritte zur Depolarisation der Zelle kommt. (Hagino-Yamagishi, 2008)

Durch diese grundlegend verschiedene Signaltransduktion des olfaktorisch sensorischen Riechepithels und des Vomeronasalorgans ist eine unterschiedliche Neuromodulation der Reizweiterleitung denkbar. So könnte die Wahrnehmung bestimmter Pheromone von der Anwesenheit des Carnosins abhängig sein. Da

Carnosin erst im Laufe der Entwicklung zum adulten Tier mehr und mehr synthetisiert wird, würden dieselben Pheromone im jungen Alter anders wahrgenommen werden als beim adulten Tier. Carnosin könnte also zum Beispiel als Neuromodulator oder Neurotransmitter eine Rolle bei der Regulation der Pheromon-Wahrnehmung spielen.

Wie bereits vermutet wird, hat Carnosin wahrscheinlich im Skelettmuskel eine andere Funktion als im Nervensystem. Die Carnosin-Konzentration nimmt im Skelettmuskel mit dem Alter und damit auch mit dem Wachstum der Mäuse zunächst zu und im höheren Alter wieder ab. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen der humanen Untersuchung überein, in der zumindest bei den männlichen Probanden zunächst eine leichte Zunahme des Muskel-Carnosins bis zu einem Alter von ~18 Jahren beobachtet wurde, wobei der jüngste Proband der Studie schon ~8 Jahre alt war und die Zunahme der Carnosin-Konzentration vielleicht schon im jüngeren Alter beginnt. Bei Frauen konnte ein solcher Anstieg nicht beobachtet werden. Sowohl bei Frauen als auch bei Männern sank die Carnosin-Konzentration dann ab einem jung adulten Alter (~18 Jahre) bis zu einem mittleren Alter (~40 Jahre) wieder ab. Im weiteren Verlauf variierte der Carnosin-Gehalt nicht mehr stark. (Baguet et al., 2012; Everaert et al., 2011)

Bei der Skelettmuskulatur werden zwei Arten von Muskelfasern unterschieden. Die langsamen S-Fasern (*slow twitch*-Fasern, Typ I), die durch ihren hohen Myoglobingehalt auch rote Fasern genannt werden, und die schnellen F-Fasern (*fast twitch*-Fasern, Typ II), die auch weiße Fasern genannt werden. Die Typ I-Fasern sind durch den hohen Gehalt an sauerstoffbindendem Myoglobin eher für die langandauernde Kontraktion (Ausdauer) zuständig, bei dem der oxidative Stoffwechsel im Vordergrund steht. Die Typ II-Fasern hingegen sind spezialisiert auf schnelle kurzandauernde Kontraktionen, bei denen der anaerobe Stoffwechsel eine größere Rolle spielt.

Es konnte gezeigt werden, dass in den Typ II-Fasern die Carnosin-Konzentration höher ist als in den Typ I-Fasern, wodurch die Hypothese zur Funktion von Carnosin als Puffersubstanz für die anfallende Milchsäure unterstützt wird (Harris et al., 1989).

Über die Anteile der Muskelfasertypen abhängig von Geschlecht und Alter gibt es widersprüchliche Berichte. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Muskelfasern von Frauen und älteren Personen kleinere Querschnittsflächen haben als die von jungen Männern. Diese kleinere Querschnittsfläche der Muskelfaser ist wiederum stärker ausgeprägt in Typ II-Fasern, wodurch argumentiert wird, dass der Anteil an Typ II-Fasern bei jungen Männern am größten ist (Simoneau und Bouchard, 1989; Staron et al., 2000).

Da Testosteron eine ähnliche geschlechts- und altersabhängige Zu- bzw. Abnahme (Feldman et al., 2002; Ramos et al., 1998) wie Carnosin zeigt und eine anabole, also muskelaufbauende Wirkung hat, wurde zunächst ein Zusammenhang zwischen der Testosteron- und der Carnosinkonzentration vermutet. In einer Gruppe von gesunden Männern konnte allerdings keine direkte Korrelation zwischen der Menge an freiem Testosteron im Plasma und der Konzentration von Carnosin im Skelettmuskel nachgewiesen werden (Everaert et al., 2011).

Die Zunahme des Carnosingehalts im Skelettmuskel von neugeborenen bis jung adulten Tieren und auch die spätere Abnahme könnte eine indirekte Folge des testosteronbedingten Muskelwachstums und des altersbedingten Muskelabbaus sein. Eine Beteiligung am Puffersystem der Typ II-Muskelfasern ist demnach weiterhin eine mögliche Funktion von Carnosin im Skelettmuskel.

6.2 Heterologe Expression und Aktivitätsbestimmung

Die bisherige Bestimmung der Carnosin-Synthase-Aktivität beschränkte sich auf eine radioaktive Methode, bei der der Einbau von radioaktiv-markiertem β -Alanin in Carnosin gemessen wurde (Drozak et al., 2010). Die Produkte der Reaktion wurden dafür vor der Messung aufwendig chromatographisch getrennt. Um Zeit und Kosten zu sparen und um auf das Arbeiten mit radioaktivem Material verzichten zu können, wurde hier eine nicht-radioaktive Methode etabliert. Auch im Hinblick auf eine Aktivitätsbestimmung im größeren Maßstab, zum Beispiel bei der

Suche nach weiteren Substraten der Carnosin-Synthase oder einem geeigneten Inhibitor, ist eine nicht-radioaktive Methode unabdingbar.

6.2.1 Heterologe Expression der murinen Carnosin-Synthase

Die Produktion der rekombinanten murinen Carnosin-Synthase erfolgte mithilfe des Baculovirus-Systems in Insektenzellen. Die Expression in Insektenzellen gewährleistet eine Proteinfaltung bzw. Proteinmodifikation, die der in Säugerzellen sehr nahe kommt. Bei früheren Versuchen, Fragmente der murinen Carnosin-Synthase in Bakterien zu exprimieren, fiel das Protein in unlöslichen Einschlusskörperchen aus (*inclusion bodies*) (Saile, 2011). Ein Vorteil von Insektenzellen gegenüber Säugerzellen ist die einfachere Handhabung und ein gut etabliertes Baculovirussystem, mit dem es möglich ist, große Suspensionskulturen zu infizieren und somit das rekombinante Protein zu exprimieren. Durch die Reinigung der rekombinanten Carnosin-Synthase in Insektenzellen konnten ~20 mg lösliches Enzym pro Liter Suspensionskultur in hoher Reinheit gewonnen werden (Abbildung 5.15).

Es konnte gezeigt werden, dass das gereinigte Protein unter nativen Bedingungen als Homotetramer mit einem Molekulargewicht von ~440 kDa vorliegt, was mit den Ergebnissen zur Expression in Säugerzellen übereinstimmt (Drozak et al., 2010). Außerdem konnte der HST-Tag proteolytisch entfernt werden, ohne dass die Aktivität beeinträchtigt wurde. Das Protein lag danach weiterhin als Homotetramer vor (Daten nicht gezeigt).

Da abgesehen von der ATP-Grasp-Domäne noch keine Informationen über die Struktur der Carnosin-Synthase bekannt sind, ist eine Kristallisierung des Proteins mit anschließender Kristallstrukturanalyse mittels Röntgenbeugung erstrebenswert. Die Versuche dazu werden aktuell mit dem hier gereinigten Protein von einer anderen Arbeitsgruppe in Kooperation durchgeführt.

6.2.2 Etablierung einer nicht-radioaktiven Methode zur Aktivitätsbestimmung der Carnosin-Synthase

Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Enzymaktivitätsbestimmung beruht auf der Eigenschaft der Carnosin-Synthase, pro synthetisiertem Dipeptid ein ATP zu hydrolysieren. Das dabei gebildete P_i kann in einer gekoppelten Enzymreaktion mit dem Enzym PNP für die Umsetzung des Substrates MESG genutzt werden, was mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 330 nm zu 360 nm einhergeht.

Bei den hier durchgeführten Enzymaktivitätsbestimmungen (Abschnitt 5.2.3 und 5.2.4) konnte gezeigt werden, dass die Reaktion der Carnosin-Synthase nur abläuft, wenn alle drei Substrate (β -Alanin, L-Histidin und ATP) in der Reaktion vorhanden sind. Des Weiteren konnte die Linearität (Korrelationskoeffizient: 0,99) der Enzymreaktion bis zur höchsten eingesetzten Enzymkonzentration nachgewiesen werden. Diese war 1 μ g Carnosin-Synthase in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l, wobei die Substrate β -Alanin, L-Histidin und ATP jeweils in einer Konzentration von 5 mM vorlagen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ebenfalls ein linearer Zusammenhang (Korrelationskoeffizient: 0,99) zwischen der Phosphatkonzentration einer Standardlösung und der gemessenen Absorption besteht, wodurch für die eingesetzte Carnosin-Synthase die spezifische Aktivität bestimmt werden konnte. Für die dargestellte Enzympräparation, konnte eine Aktivität von $\sim 150 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ errechnet werden. Aus den Aktivitätsbestimmungen von anderen Enzympräparationen wurden für die Carnosin-Synthase spezifische Aktivitäten von $\sim 70\text{-}550 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die Schwankungen dieser Werte können verschiedene Ursachen haben. Der bedeutendste Faktor ist dabei wohl die Reinheit der Enzympräparation. Mit der hier verwendeten Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird der Gesamtproteingehalt ermittelt. Je nach Verunreinigungsgrad der Enzympräparation wurden also verfälschte Mengen aktiver Carnosin-Synthase in die Enzymreaktion eingesetzt. Ein weiterer Punkt ist demnach auch die Genauigkeit der Proteinbestimmung und der Anteil an aktiver Carnosin-Synthase. Da einzelne Enzymmoleküle durch äußere Bedingungen wie Temperatur und Lagerungszeit ihre Aktivität verlieren können,

schwankt auch der Anteil an aktiver Carnosin-Synthase in der Proteinlösung. Die hier bestimmten spezifischen Aktivitäten liegen aber alle in einem ähnlichen Bereich und sind mit den höchsten in der Literatur beschriebenen Werten vergleichbar (Drozak et al., 2010). Die dort ermittelten spezifischen Aktivitäten für die murine Carnosin-Synthase können aus den V_{\max} -Werten der K_m -Wert-Bestimmungen abgelesen werden (β -Alanin $300 \pm 10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, L-Histidin $0,6 \pm 0,02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und ATP $0,67 \pm 0,02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Mittelwerte \pm SE)). Diese Werte weisen eine relative hohe Abweichung voneinander auf, obwohl V_{\max} unter gesättigten Bedingungen unabhängig vom Substrat die maximale Reaktionsgeschwindigkeit darstellt und daher gleich sein sollte. Wie in der Veröffentlichung allerdings angegeben ist, fand die K_m -Wert-Bestimmung für ATP und L-Histidin mit einer β -Alanin-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ außerhalb des Sättigungsbereichs statt. Bei der K_m -Wert-Bestimmung von β -Alanin lagen die anderen beiden Substrate L-Histidin und ATP in gesättigten Konzentrationen (3 mM) vor. Daher kann nur die hieraus bestimmte spezifische Aktivität mit $300 \pm 10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ mit der in dieser Arbeit ermittelten verglichen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier ermittelten Werte ($\sim 70\text{-}550 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) für die spezifische Aktivität der murinen Carnosin-Synthase in derselben Größenordnung wie die in der Literatur beschriebenen Werte liegen. Wie in der dargestellten Michaelis-Menten-Kinetik zu erkennen ist (Abbildung 5.20), wird mit jeweils der höchsten Substratkonzentration (5 mM) eine Sättigung der Kurve erreicht. Diese nicht-radioaktive Methode liefert also vergleichbare Ergebnisse wie die radioaktive und eignet sich demnach zur verlässlichen Enzymaktivitätsbestimmung der Carnosin-Synthase.

6.2.3 K_m -Wert-Bestimmung

Eine weitere wichtige Kenngröße für eine enzymatische Reaktion ist die Michaelis-Menten-Konstante (K_m -Wert), die der Substratkonzentration bei halb-maximaler Reaktionsgeschwindigkeit entspricht. Diese ist für jedes Substrat einzeln zu ermitteln und unabhängig von dem Anteil aktiven Enzyms in der Proteinlösung. Für den Fall, dass die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes eine sehr viel

größere Geschwindigkeitskonstante hat als die Spaltung des Substrats, entspricht der K_m -Wert der Dissoziationskonstante (K_d) und ist somit ein Maß für die Affinität eines Enzyms zum Substrat. Je kleiner der K_m -Wert ist, desto höher ist die Affinität zu diesem Substrat.

Aus der Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 5.20) wurde für β -Alanin ein K_m -Wert von $161,30 \pm 30,67 \mu\text{M}$, für L-Histidin von $32,31 \pm 6,49 \mu\text{M}$ und für ATP von $164,60 \pm 31,43 \mu\text{M}$ (Mittelwerte \pm SD, $n = 2$) ermittelt. Die entsprechenden Literaturwerte (Drozak et al., 2010) sind $460 \pm 40 \mu\text{M}$ für β -Alanin, $110 \pm 10 \mu\text{M}$ für L-Histidin und $570 \pm 50 \mu\text{M}$ für ATP (Mittelwerte \pm SE), wobei dort wie bereits erwähnt nicht in allen Reaktionen die anderen Substrate in gesättigten Konzentrationen eingesetzt wurden. Aus diesem Grund können diese Daten lediglich für die Einschätzung einer ähnlichen Größenordnung herangezogen werden. Im Vergleich mit den hier bestimmten Werten liegen diese demnach in einem gleichen Bereich. Die K_m -Wert-Bestimmung der Carnosin-Synthase wurde erstmals in dieser Arbeit unter geeigneten Bedingungen mit gesättigten Substratkonzentrationen durchgeführt. Anhand der K_m -Werte kann geschlossen werden, dass die Carnosin-Synthase für L-Histidin die höchste Affinität aufweist und die Affinität zu β -Alanin und ATP sehr ähnlich ist. Um dies tatsächlich nachzuweisen, müssten weitere Untersuchungen, wie beispielsweise ein Ligandenbindungstest, durchgeführt werden.

Die physiologischen Konzentrationen der Substrate β -Alanin, L-Histidin und ATP liegen alle in einem ähnlichen Bereich wie die hier ermittelten K_m -Werte der Carnosin-Synthase. Die physiologischen Konzentrationen von L-Histidin und ATP liegen etwas darüber, lediglich die Konzentration von β -Alanin ist im zentralen Nervensystem von Ratten mit $\sim 40\text{-}60 \mu\text{M}$ (Del Rio et al., 1977) kleiner als der K_m -Wert von $161,30 \pm 30,67 \mu\text{M}$. Dies verdeutlicht, dass es sich bei der nicht-proteinogenen Aminosäure β -Alanin um das begrenzende Vorläufermolekül des Dipeptids Carnosin handelt und L-Histidin und ATP im Überschuss vorliegen.

6.2.4 Substratspezifität der murinen Carnosin-Synthase

Ein mögliches Anwendungsgebiet der hier etablierten nicht-radioaktiven Methode zur Enzymaktivitätsbestimmung sind Untersuchungen zur Substratspezifität der Carnosin-Synthase. Da bereits bekannt ist, dass die Carnosin-Synthase nicht nur Carnosin aus β -Alanin und L-Histidin, sondern auch Homocarnosin aus GABA und L-Histidin synthetisiert (Kalyankar und Meister, 1959), ist es denkbar, dass die Carnosin-Synthase keine sehr hohe Substratspezifität aufweist, sondern mehrere Substratkombinationen möglich sind. In den hier durchgeführten Untersuchungen dazu (Abbildung 5.21) konnte gezeigt werden, dass neben β -Alanin bzw. GABA und L-Histidin auch β -Alanin in Kombination mit L-Arginin als Substrate möglich sind, wobei die Aktivität bei der Bildung von Carnosin ($2,13 \Delta\text{mAU min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) dabei höher ist als bei der Bildung von Homocarnosin ($1,42 \Delta\text{mAU min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) und β -Alanyl-L-arginin ($1,41 \Delta\text{mAU min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$). Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen, bei denen L-Arginin bereits als Substrat der murinen Carnosin-Synthase beschrieben wurde (Drozak et al., 2010). Neben L-Arginin wurden dort auch L-Ornithin, L-2,4-Diaminobuttersäure und L-Lysin als Substrate der murinen Carnosin-Synthase in Kombination mit β -Alanin identifiziert. L-Lysin konnte in denselben Untersuchungen unter anderem auch als Substrat für die humane Carnosin-Synthase identifiziert werden. Aufgrund der spezifischen Aktivität für diese Dipeptide (β -Alanyl-L-lysin: $246 \pm 9 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und Carnosin: $770 \pm 11 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; Mittelwerte \pm SE) und der Tatsache, dass die Konzentration von L-Lysin ($2,13 \pm 0,2 \mu\text{M/kg}$ Trockengewicht, Mittelwert \pm SE) im humanen Skelettmuskel 1,5-fach höher ist als die von L-Histidin ($1,49 \pm 0,13 \mu\text{M/kg}$ Trockengewicht, Mittelwert \pm SE) (Graham et al., 2000), wurde erwartet, dass β -Alanyl-L-lysin in einer Konzentration auftritt, die in etwa 10 % der Konzentration von Carnosin entspricht. Da β -Alanyl-L-lysin in diesem Gewebe aber nicht nachgewiesen werden konnte, wurde postuliert, dass es eine weitere Dipeptidase gibt, die dieses Dipeptid direkt wieder abbaut (Drozak et al., 2010). In denselben Untersuchungen konnte auch für die Carnosin-Synthase aus Maus und Huhn gezeigt werden, dass ihre Substratspezifitäten nicht sehr hoch sind. Aus diesem Grund wurde dieser Mechanismus als generelle Produktkontrolle vorgeschlagen. Diese unspezifische Dipeptidase würde eben solche Dipeptide

abbauen, die „fälschlicherweise“ von der Carnosin-Synthase gebildet wurden. Carnosin und Homocarnosin würden aber keine Substrate für eben diese Dipeptidase sein. Mittlerweile konnte diese β -Alanyllysin-Dipeptidase als PM20D2 identifiziert werden (Veiga-da-Cunha et al., 2014). Sie hydrolysiert vor allem β -Alanyllysin, β -Alanylornithin, γ -Aminobutyryllysin und γ -Aminobutyrylornithin, aber auch β -Alanylarginin und γ -Aminobutyrylarginin, allerdings weniger effizient. Carnosin und Homocarnosin sind scheinbar keine Substrate dieser Dipeptidase.

Ein möglicher Erklärungsansatz, wieso die Carnosin-Synthase eine geringe Substratspezifität zeigt, könnte sein, dass es sich dabei um einen weiteren Regulationsmechanismus handelt. Die oben genannten zusätzlichen Substrate könnten dabei als kompetitive Inhibitoren wirken und die Synthese von Carnosin oder Homocarnosin vermindern. Ein weiterer Hinweis darauf sind die Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen an muriner Carnosin-Synthase, die aus Riechhirn gereinigt wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass L-Ornithin und L-Lysin die Synthese von Carnosin kompetitiv hemmen (Horinishi et al., 1978).

Der Hintergrund, warum in dieser Arbeit weitere Aminosäuren (Serin, Taurin, Tyrosin) als Substrate der Carnosin-Synthase getestet wurden (Abschnitt 5.2.6) ist, dass es einige Neuropeptide gibt, bei denen zum Teil noch kein synthetisierendes Enzym bekannt ist. So wurde zum Beispiel für das Dipeptid Seryltaurin nachgewiesen, dass es von der zellfreien, löslichen Fraktion eines Gehirnhomogenates der Maus synthetisiert wird (Lähdesmäki, 1987). Es wurde allerdings noch keine entsprechende Peptidsynthase gefunden. Des Weiteren wurde das Dipeptid Kyotorphin (Tyrosylarginin) im zentralen Nervensystem von Ratten gefunden (Ueda et al., 1980), auch dabei ist der Syntheseweg noch unbekannt. Zwar konnte hier gezeigt werden, dass diese beiden Peptide nicht von der Carnosin-Synthase gebildet werden, die hier etablierte nicht-radioaktive Methode zur Enzymaktivitätsbestimmung der Carnosin-Synthase bietet aber eine Möglichkeit im größeren Maßstab weitere Substraten zu identifizieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Carnosin-Synthase keine besonders hohe Substratspezifität aufweist. Sowohl an die Position von β -Alanin als auch an die von L-Histidin können andere Aminosäuren treten, wobei bisher

mehr Aminosäuren gefunden wurden, die von der Carnosin-Synthase an β -Alanin geknüpft werden können als an L-Histidin (Drozak et al., 2010). Weitere Erkenntnisse über die Spezifität des Enzyms und dessen Substratbindungsstellen könnten durch die Aufklärung der Kristallstruktur erlangt werden, woran wie oben erwähnt bereits gearbeitet wird.

6.3 Erklärungsansatz zur physiologischen Funktion von Carnosin bzw. β -Alanin und Anwendungsgebiet für die Enzymaktivitätsbestimmung

Wie bereits in Abschnitt 2.2.6 erläutert, wird unter anderem postuliert, dass nicht Carnosin eine wichtige Rolle im Nervengewebe spielt, sondern β -Alanin als Neurotransmitter fungiert (Tiedje et al., 2010). Carnosin würde somit als β -Alanin-Speicher dienen, welches bei Bedarf durch die Spaltung von Carnosin durch die Carnosinase im Extrazellularraum freigesetzt werden kann (Baslow, 2010; Van Kuilenburg et al., 2004). Mittels Northern Blot-Analyse konnte bereits gezeigt werden, dass die Carnosinase (CN1) im humanen Gehirn exprimiert ist. Des Weiteren konnte mittels Western Blot-Analysen das Enzym in der Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden (Teufel et al., 2003). Dies weist zusammen mit der Tatsache, dass CN1 auch in der Leber gebildet wird und ins Blut ausgeschüttet wird, darauf hin, dass es für dieses Enzym einen effizienten Sezernierungsmechanismus gibt. In *in vivo* Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass Carnosin bei Depolarisation von isolierten Synaptosomen des Riechhirns kalziumabhängig ausgeschüttet wird (Rochel und Margolis, 1982).

Für diese Theorie spricht außerdem, dass bei einer Defizienz der Carnosinase beim Menschen, bei der es zur Anreicherung von Carnosin im Blut (Carnosinemia) und im Urin (Carnosinuria) kommt, verschiedene Symptome, hauptsächlich neurologische Störungen, auftreten können (Perry et al., 1968). Dazu gehören mentale Retardierung, Hypotonie, myoklonische Anfälle und spastische Paraplegie. Sollte nun tatsächlich β -Alanin eine wichtige Funktion im Nervensystem haben, dann könnte es bei einer Carnosinase-Defizienz zu den

neurologischen Symptomen kommen, weil aus dem freien β -Alanin ständig sofort Carnosin gebildet wird und freies β -Alanin nicht mehr zur Verfügung gestellt wird.

Mit diesem Erklärungsansatz würde es auch eine Begründung für den axonalen Transport der Carnosin-Synthase ins Riechhirn geben. Das würde bedeuten, dass es nicht darum geht, vor Ort Carnosin zur Verfügung zu stellen, sondern das von der Carnosinase freigesetzte β -Alanin wieder abzufangen, um auf diese Weise dessen neuromodulare Wirkung zu beenden. Um diese Hypothese zu untermauern müssten allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Berichte über Carnosinase-Defizienzen beim Menschen zeigten, dass eine heterozygote Defizienz mit verminderter Carnosinase-Aktivität, nicht zu den neurologischen Symptomen der homozygoten Carnosinase-Defizienz führt (Willi et al., 1997). Dies zeigt, dass eine leicht verminderte Carnosinase-Aktivität offenbar nicht zu einem Krankheitsbild führt. Es wird also noch ausreichend β -Alanin freigesetzt. Die Symptome treten erst auf, wenn der Patient fast keine Carnosinase-Aktivität mehr aufweist. Ein möglicher Therapieansatz wäre demnach eine Enzymersatztherapie, bei der die fehlende Carnosinase injiziert wird. Bei Enzymen, die im Gehirn benötigt werden, ist eine häufige Herausforderung der Enzymersatztherapie die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Ein anderer Ansatz wäre die Aktivität der Carnosin-Synthase zu verringern.

Patienten mit einer Carnosin-Synthase-Defizienz sind nicht bekannt und auch Carnosin-Synthase-defiziente Mäuse (*Carns1-knock-out-Maus*) haben keinen offensichtlichen Phänotyp und sind neurologisch unauffällig, wobei detaillierte Verhaltensanalysen noch ausstehen. Sie sind außerdem fertil und haben eine normale Lebenserwartung (persönliche Mitteilung von Dr. Matthias Eckhardt). Da selbst eine vollständige Carnosin-Synthase-Defizienz scheinbar keine offensichtlichen Symptome hervorruft, könnte durch die Verabreichung eines Carnosin-Synthase-Inhibitors die Konzentration an Carnosin reduziert werden und damit die Menge an freiem β -Alanin erhöht werden.

Für die Suche nach einem Inhibitor eignet sich eine nicht-radioaktive Methode zur Aktivitätsbestimmung besser als eine radioaktive, vor allem, wenn sie für hochdurchsatzfähige Aktivitätsbestimmungen optimiert wird. Die hier etablierte

Methode wurde bereits für die Messung in einer Mikrotiterplatte (384-well) angepasst, wodurch Zeit und Kosten gespart werden, und die Möglichkeit besteht, die Abläufe mithilfe von Robotern zu automatisieren. Diese Methode könnte also nach einer weiteren Optimierung für eine Hochdurchsatztestung großer Substanzbibliotheken genutzt werden, um einen spezifischen Inhibitor für die Carnosin-Synthase zu finden. Ein Beispiel für die bereits erfolgreiche, klinische Anwendung einer solchen Substratreduktionstherapie ist Morbus Gaucher Typ I, bei der N-butyldeoxynojirimycin (Miglustat, NB-DNJ) als Inhibitor der Glukosylceramid-Synthase wirkt und somit den ersten Schritt der Glykolipidsynthese hemmt (Heitner et al., 2002).

Zusammengenommen konnte in dieser Arbeit die murine Carnosin-Synthase sowohl in Bezug auf ihre Expression im Gewebe als auch auf ihre Aktivität weiter charakterisiert werden. Es konnten unter anderem wichtige Erkenntnisse über die Transkriptvarianten der Carnosin-Synthase gewonnen werden, die bei der weiteren Forschung von Bedeutung sein können.

7 Literaturverzeichnis

Abraham, D., Pisano, J.J., and Udenfriend, S. (1962). The distribution of homocarnosine in mammals. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 99, 210–213.

Baguet, A., Everaert, I., Achten, E., Thomis, M., and Derave, W. (2012). The influence of sex, age and heritability on human skeletal muscle carnosine content. *Amino Acids* 43, 13–20.

Baran, E.J., Parajón-Costa, B.S., Rojo, T., Sáez-Puche, R., Fernández, F., Tótaró, R.M., Apella, M.C., Etcheverry, S.B., and Torre, M.H. (1995). Spectroscopic, magnetic, and electrochemical behavior of the copper(II) complex of carnosine. *Journal of Inorganic Biochemistry* 58, 279–289.

Baslow, M.H. (2010). A novel key-lock mechanism for inactivating amino acid neurotransmitters during transit across extracellular space. *Amino Acids* 38, 51–55.

Bate-Smith, E.C. (1938). The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine. *The Journal of Physiology* 92, 336–343.

Bauer, K., Hallermayer, K., Salnikow, J., Kleinkaufs, H., and Hamprecht, B. (1982). Biosynthesis of carnosine and related peptides by glial cells in primary culture. *The Journal of Biological Chemistry* 257, 3593–3597.

Boldyrev, A.A., Dupin, A.M., Pindel, E. V., and Severin, S.E. (1988). Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 89 B, 245–250.

Boldyrev, A.A., Gallant, Steven, C., and Sukhich, G.T. (1999). Carnosine, the protective, anti-aging peptide. *Bioscience Reports* 19, 581–587.

Boldyrev, A.A., Aldini, G., and Derave, W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews* 93, 1803–1845.

Bonfanti, L., Peretto, P., De Marchis, S., and Fasolo, A. (1999). Carnosine-related

dipeptides in the mammalian brain. *Progress in Neurobiology* 59, 333–353.

Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765–775.

Brown, C.E. (1981). Interactions among carnosine, anserine, opidine and copper in biochemical adaptation. *Journal of Theoretical Biology* 88, 245–256.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156–159.

Corona, C., Frazzini, V., Silvestri, E., Lattanzio, R., La Sorda, R., Piantelli, M., Canzoniero, L.M.T., Ciavardelli, D., Rizzarelli, E., and Sensi, S.L. (2011). Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice. *PloS One* 6, e17971.

Crowe, M.J., and Pixley, S.K. (1991). Monoclonal antibody to carnosine synthetase identifies a subpopulation of frog olfactory receptor neurons. *Brain Research* 538, 147–151.

Crush, K.G. (1970). Carnosine and related substances in animal tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* 34, 3–30.

Davey, C.L. (1960). The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 89, 303–308.

Dobbie, H., and Kermack, W.O. (1955). Complex-formation between polypeptides and metals: 2. the reaction between cupric ions and some dipeptides. *Biochemical Journal* 59, 246–257.

Drozak, J., Veiga-da-Cunha, M., Vertommen, D., Stroobant, V., and Van Schaftingen, E. (2010). Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *The Journal of Biological Chemistry* 285, 9346–9356.

Drozak, J., Chrobok, L., Poleszak, O., Jagielski, A.K., and Derlacz, R. (2013). Molecular identification of carnosine N-methyltransferase as chicken histamine N-

methyltransferase-like protein (HNMT-like). *PloS One* 8, e64805.

Dulac, C. (1997). Molecular biology of pheromone perception in mammals. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 8, 197–205.

Dutka, T.L., and Lamb, G.D. (2004). Effect of carnosine on excitation-contraction coupling in mechanically-skinned rat skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 25, 203–213.

Everaert, I., Mooyaart, A., Baguet, A., Zutinic, A., Baelde, H., Achten, E., Taes, Y., De Heer, E., and Derave, W. (2011). Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino Acids* 40, 1221–1229.

Fawaz, M. V, Topper, M.E., and Firestine, S.M. (2011). The ATP-grasp enzymes. *Bioorganic Chemistry* 39, 185–191.

Feldman, H.A., Longcope, C., Derby, C.A., Johannes, C.B., Araujo, A.B., Coviello, A.D., Bremner, W.J., and McKinlay, J.B. (2002). Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: Longitudinal results from the massachusetts male aging study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87, 589–598.

Finking, R., and Marahiel, M. a (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology* 58, 453–488.

Fonteh, A., Harrington, R., Tsai, A., Liao, P., and Harrington, M. (2007). Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects. *Amino Acids* 32, 213–224.

Goodrich, J.A., and Kugel, J.F. (2006). Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 7, 612–616.

Graham, T.E., Sgro, V., Friars, D., and Gibala, M.J. (2000). Glutamate ingestion: the plasma and muscle free amino acid pools of resting humans. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 278, E83–E89.

Gulewitsch, W. and Amiradzibi, S. (1900). Über das Carnosin, eine neue

organische Base des Fleischextraktes. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 33, 1902–1903.

Hagino-Yamagishi, K. (2008). Diverse systems for pheromone perception: multiple receptor families in two olfactory systems. *Zoological Science* 25, 1179–1189.

Harding, J.W., Getchell, T. V, and Margolis, F.L. (1976). Denervation of the primary olfactory pathway in mice: III. Effect of enzymes of carnosine metabolism. *Brain Research* 110, 351–360.

Harris, R.C., Dunnett, M., and Greenhaff, P.L. (1989). Carnosine and taurine contents in individual fibres of human vastus lateralis muscle. *Journal of Sport Science* 16, 639–643.

Harris, R.C., Tallon, M.J., Dunnett, M., Boobis, L., Coakley, J., Kim, H.J., Fallowfield, J.L., Hill, C.A., Sale, C., and Wise, J.A. (2006). The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids* 30, 279–289.

Heitner, R., Elstein, D., Aerts, J., Weely, S. van, and Zimran, A. (2002). Low-dose N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) for type I Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 28, 127–133.

Hett, A., and West, S. (2014). Inhibition of U4 snRNA in human cells causes the stable retention of polyadenylated pre-mRNA in the nucleus. *PLoS ONE* 9, e96174.

Hoffmann, A.M., Bakardjiev, A., and Bauer, K. (1996). Carnosine-synthesis in cultures of rat glial cells is restricted to oligodendrocytes and carnosine uptake to astrocytes. *Neuroscience Letters* 215, 29–32.

Horinishi, H., Grillo, M., and Margolis, F.L. (1978). Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *Journal of Neurochemistry* 31, 909–919.

Kalyankar, G.D., and Meister, A. (1959). Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides. *The Journal of Biological*

Chemistry 224, 3210–3218.

Kim, M.Y., Kim, E.J., Kim, Y.N., Choi, C., and Lee, B.H. (2011). Effects of α -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats. *Nutrition Research and Practice* 5, 421–428.

Klebanov, G.I., Teselkin Yu O, Babenkova, I. V, Popov, I.N., Levin, G., Tyulina, O. V, Boldyrev, a a, and Vladimirov YuA (1997). Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine. *Biochemistry and Molecular Biology International* 43, 99–106.

Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C., and Ames, B.N. (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3175–3179.

Van Kuilenburg, A.B.P., Stroomer, A.E.M., Van Lenthe, H., Abeling, N.G.G.M., and Van Gennip, A.H. (2004). New insights in dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: a pivotal role for beta-aminoisobutyric acid? *The Biochemical Journal* 379, 119–124.

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

Lähdesmäki, P. (1987). Biosynthesis of taurine peptides in brain cytoplasmic fraction in vitro. *International Journal of Neuroscience* 37, 79–84.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.

Marahiel, M. a., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* 97, 2651–2674.

De Marchis, S., Modena, C., Peretto, P., Migheli, A., Margolis, F.L., and Fasolo, A. (2000). Carnosine-related dipeptides in neurons and glia. *Biochemistry. Biokhimiia*

65, 824–833.

Margolis, F.L. (1974). Carnosine in the primary olfactory pathway. *Science* 184, 909–911.

Margolis, F.L., and Grillo, M. (1977). Axoplasmic transport of carnosine (beta-alanyl-L-histidine) in the mouse olfactory pathway. *Neurochemical Research* 2, 507–519.

Margolis, F.L., Grillo, M., Hempstead, J., and Morgan, J.I. (1987). Monoclonal antibodies to mammalian carnosine synthetase. *Journal of Neurochemistry* 48, 593–600.

Miller, D.J., and O'Dowd, A. (2000). Vascular smooth muscle actions of carnosine as its zinc complex are mediated by histamine H1 and H2 receptors. *Biochemistry. Biokhimiia* 65, 798–806.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1, 263–273.

Münch, G., Mayer, S., Michaelis, J., Hipkiss, A.R., Riederer, P., Müller, R., Neumann, A., Schinzel, R., and Cunningham, A.M. (1997). Influence of advanced glycation end-products and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerization of β -amyloid peptide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1360, 17–29.

Murzin, A.G. (1996). Structural classification of proteins: New superfamilies. *Current Opinion in Structural Biology* 6, 386–394.

Ng, R.H., Marshall, F.D., Henn, F.A., and Sellström, A. (1977). Metabolism of carnosine and homocarnosine in subcellular fractions and neuronal and glial cell-enriched fraction of rabbit brain. *Journal of Neurochemistry* 28, 449–452.

Noguchi, T., Inoue, H., and Tanaka, T. (1986). The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *Journal of Biological Chemistry* 261, 13807–13812.

O'Dowd, A., and Miller, D.J. (1998). Analysis of an H1 receptor-mediated, zinc-

potentiated vasoconstrictor action of the histidyl dipeptide carnosine in rabbit saphenous vein. *British Journal of Pharmacology* 125, 1272–1280.

Pavlov, A.R., Revina, A.A., Dupin, A.M., Boldyrev, A.A., and Yaropolov, A.I. (1993). The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. *Biochemica et Biophysica Acta* 1157, 304–312.

Perry, T., Hansen, S., and Love, D. (1968). Serum-carnosinase deficiency in carnosinemia. *The Lancet* 1229–1230.

Pfister, F., Riedl, E., Wang, Q., Hagen, F., Deinzer, M., Harmsen, M.C., Molema, G., Feng, Y., and Hammes, H. (2011). Oral carnosine supplementation prevents vascular damage in experimental diabetic retinopathy. *Cellular Physiology and Biochemistry* 28, 125–136.

Philipps, B., Rotmann, D., Wicki, M., Mayr, L.M., and Forstner, M. (2005). Time reduction and process optimization of the baculovirus expression system for more efficient recombinant protein production in insect cells. *Protein Expression and Purification* 42, 211–218.

Preston, J.E., Hipkiss, a R., Himsworth, D.T., Romero, I. a, and Abbott, J.N. (1998). Toxic effects of beta-amyloid(25-35) on immortalised rat brain endothelial cell: Protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine. *Neuroscience Letters* 242, 105–108.

Ramos, E., Frontera, W.R., Llopart, A., and Feliciano, D. (1998). Muscle strength and hormonal levels in adolescents: Gender related differences. *International Journal of Sports Medicine* 19, 526–531.

Ray, K., Perez, S.E., Yang, Z., Xu, J., Ritchings, B.W., Steller, H., and Goldstein, L.S.B. (1999). Kinesin-II is required for axonal transport of cholin acetyltransferase in drosophila. *The Journal of Cell Biology* 147, 507–517.

Riedl, E., Pfister, F., Braunagel, M., Brinkkötter, P., Sternik, P., Deinzer, M., Bakker, S.J.L., Henning, R.H., Van Den Born, J., Krämer, B.K., et al. (2011). Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats. *Cellular Physiology and Biochemistry* 28, 279–288.

- Del Rio, R.M., Orensanz, M., and DeFeudis, F.V. (1977). Contents of β -alanine and γ -aminobutyric acid in regions of rat CNS. *Experimental Brain Research* 28, 225–227.
- Ririe, D.G., Roberts, P.R., Shouse, M.N., and Zaloga, G.P. (2000). Vasodilatory actions of the dietary peptide carnosine. *Nutrition* 16, 168–172.
- Rochel, S., and Margolis, F.L. (1982). Carnosine release from olfactory bulb synaptosomes is calcium-dependent and depolarization-stimulated. *Journal of Neurochemistry* 38, 1505–1514.
- Saile, A. (2011). Diplomarbeit: Generierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen die murine Carnosin-Synthase. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Sakai, M., Yoshida, M., Karasawa, N., Teramura, M., Ueda, H., and Nagatsu, I. (1987). Carnosin-like immunoreactivity in the primary olfactory neuron of the rat. *Experientia* 43, 298–300.
- Sakai, M., Ashihara, M., Nishimura, T., and Nagatsu, I. (1990). Carnosine-like immunoreactivity in human olfactory mucosa. *Acta Oto-Laryngologica* 109, 450–453.
- Sassoè-Pognetto, M., Cantino, D., Panzanelli, P., Verdun di Cantogno, L., Giustetto, M., Margolis, F.L., De Biasi, S., and Fasolo, A. (1993). Presynaptic colocalization of carnosine and glutamate in olfactory neurones. *Chemical, Electrical and Magnetic Senses* 5, 7–10.
- Sauerhöfer, S., Yuan, G., Braun, G.S., Deinzer, M., Neumaier, M., Gretz, N., Floege, J., Kriz, W., van der Woude, F., and Moeller, M.J. (2007). L-Carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. *Diabetes* 56, 2425–2432.
- Seidler, N.W., Yeargans, G.S., and Morgan, T.G. (2004). Carnosine disaggregates glycated alpha-crystallin: An in vitro study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 427, 110–115.

Simoneau, J. a, and Bouchard, C. (1989). Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *The American Journal of Physiology* 257, E567–E572.

Smith, C.W., Patton, J.G., and Nadal-Ginard, B. (1989). Alternative splicing in the control of gene expression. *Annual Review of Genetics* 23, 527–577.

Smith, J.E., Alvarez-Dominguez, J.R., Kline, N., Huynh, N.J., Geisler, S., Hu, W., Coller, J., and Baker, K.E. (2014). Translation of small open reading frames within unannotated RNA transcripts in *saccharomyces cerevisiae*. *Cell Reports* 7, 1858–1866.

Soliman, K.M., Mohamed, A.M., and Metwally, N.S. (2007). Attenuation of some metabolic deteriorations induced by diabetes mellitus using carnosin. *Journal of Applied Sciences* 7, 2252–2260.

Staron, R.S., Hagerman, F.C., Hikida, R.S., Hostler, D., Ragg, K.E., Murray, T.F., and Toma, K. (2000). Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48, 623–629.

Sugnet, C.W., Srinivasan, K., Clark, T.A., O'Brien, G., Cline, M.S., Wang, H., Williams, A., Kulp, D., Blume, J.E., Haussler, D., et al. (2006). Unusual intron conservation near tissue-regulated exons found by splicing microarrays. *PLoS Computational Biology* 2, e4.

Suyama, M., and Maruyama, M. (1969). Identification of methylated beta-alanylhistidine in the muscles of snake and dolphin. *The Journal of Biochemistry* 66, 405–407.

Tamba, M., and Torreggiani, A. (1998). A pulse radiolysis study of carnosine in aqueous solution. *International Journal of Radiation Biology* 74, 333–340.

Teufel, M., Saudek, V., Ledig, J.-P., Bernhardt, A., Boularand, S., Carreau, A., Cairns, N.J., Carter, C., Cowley, D.J., Duverger, D., et al. (2003). Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 6521–6531.

Tiedje, K.E., Stevens, K., Barnes, S., and Weaver, D.F. (2010). Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochemistry International* 57, 177–188.

Traut, T.W., and Loechel, S. (1984). Pyrimidine catabolism: Individual characterization of the three sequential enzymes with a new assay. *Biochemistry* 23, 2533–2539.

Ueda, H., Shiomi, H., and Takagi, H. (1980). Regional distribution of a novel analgesic dipeptide kyotorphin (Tyr-Arg) in the rat brain and spinal cord. *Brain Research* 198, 460–464.

Veiga-da-Cunha, M., Chevalier, N., Stroobant, V., Vertommen, D., and Van Schaftingen, E. (2014). Metabolite proofreading in carnosine and homocarnosine synthesis: Molecular identification of PM20D2 as β -alanyl-lysine dipeptidase. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 19726–19736.

du Vigneaud, V., and Hunt, M. (1936). The synthesis of d-carnosine, the enantiomorph of the naturally occurring form, and a study of its depressor effect on the blood pressure. *The Journal of Biological Chemistry* 93–100.

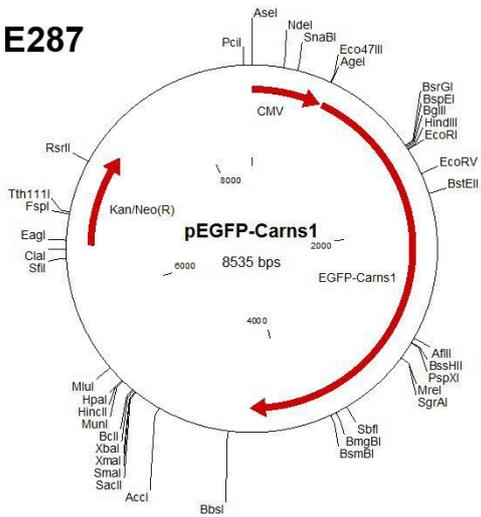
Wang, H., Iacoangeli, A., Lin, D., Williams, K., Denman, R.B., Hellen, C.U.T., and Tiedje, H. (2005). Dendritic BC1 RNA in translational control mechanisms. *Journal of Cell Biology* 171, 811–821.

Willi, S.M., Zhang, Y., Hill, J.B., Phelan, M.C., Michaelis, R.C., and Holden, K.R. (1997). A deletion in the long arm of chromosome 18 in a child with serum carnosinase deficiency. *Pediatric Research* 41, 210–213.

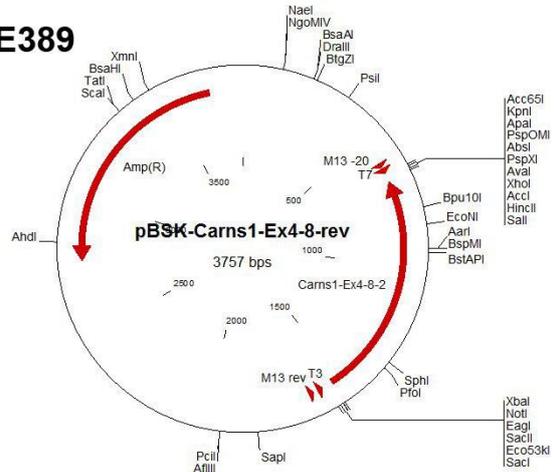
8 Anhang

Plasmidkarten:

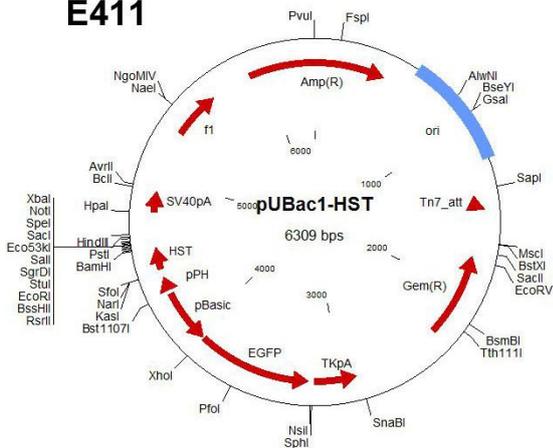
E287



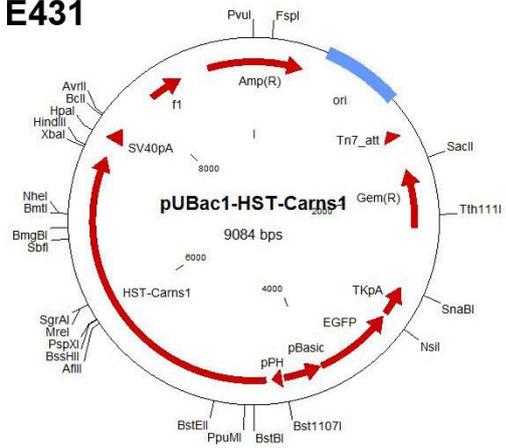
E389



E411



E431



Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Bonn, Juni 2016

Jana Asisa Saile

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. V. Gieselmann für die Möglichkeit der Promotion am IBMB und für die stete Unterstützung des Projektes bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Witke für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Bei der NRW International Graduate Research School BIOTECH-PHARMA möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Matthias Eckhardt für seine gute Betreuung, da er mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des IBMBs bedanken, vor allem bei der AG Gieselmann für die tolle Zeit in dieser bunten Arbeitsgruppe. Besonderer Dank geht dabei natürlich an die gesamte „Familie“ Eckhardt mit Elvira, Ivonne, Izzie, Klaudine de Brysché, Lena, Lihua, Raupe, Silvia und Adoptivkind Pezzie, die mich herzlichst aufgenommen haben und eine große Unterstützung während meiner Zeit im Labor waren. Ich kann mir keine bessere Arbeitsgruppe vorstellen, da nicht nur die Arbeitsatmosphäre sehr angenehm war, sondern ich auch die mit Euch verbrachten privaten Stunden nicht missen möchte.

Ein ebenso großer Dank geht an Alle, die mir während der letzten Wochen beim Schreiben dieser Arbeit zur Seite standen und mit mir die ein oder andere Sache ausgiebig diskutiert haben. Bedanken möchte ich mich zudem bei all meinen Freunden, die mich sehr in den letzten Jahren unterstützt haben. Ohne einen so tollen Freundeskreis wäre diese Zeit in Bonn nicht annähernd so schön, ereignisreich und besonders gewesen.

Darüber hinaus bedanke ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium ermöglicht haben, sondern auch immer an mich geglaubt haben und mich in allem unterstützt haben. Ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen! Zuletzt geht ein besonderer Dank an Boris für seine unglaubliche Unterstützung, Motivation und Geduld während der gesamten Zeit. Ich weiß, dass ich mich immer auf Dich verlassen kann. Danke dafür!

Lebenslauf