

Antje van den Berg

Dr. med.

Characterization of the Carnosinase 2 and its Importance in Diabetic Stress *in Vitro*

Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Claus Peter Schmitt

Carnosin und Anserin sind Histidin-Dipeptide mit antioxidativen und nephroprotektiven Eigenschaften, die natürlicherweise in Muskel-, Hirn und Nierengewebe vorkommen. Zwei Dipeptidasen im menschlichen Organismus, Carnosinase 1 (CN1) und Carnosinase 2 (CN2), können Carnosin und Anserin abbauen. Während CN1 spezifisch den Abbau von Carnosin und strukturell eng verwandten Derivaten katalysiert, ist die Rolle von CN2 *in vivo* umstritten, da das pH-Optimum dieses Enzyms für den Abbau von Carnosin sich weit im basischen Bereich befindet. Mehrere genomweite Kopplungsanalysen zeigten eine Korrelation zwischen Polymorphismen im Bereich der Gene für Carnosinase 1 und 2 (CNDP1 und 2) und dem Risiko eine diabetische Nephropathie zu entwickeln.

Zielstellung dieser Dissertation war es, den intrinsischen Carnosinstoffwechsel in Nierenzellen sowie die Bedeutung der Carnosinasen 1 und 2 weiter zu charakterisieren. Dazu wurden Mesangial- (Mes 13)- und Tubuluszellen (HK-2) kultiviert, die Expression der Carnosin metabolisierenden Enzyme mittels qPCR und Western Blot studiert, der enzymatische Carnosinabbau mithilfe eines fluoreszenz-basierten enzymatischen Assays quantifiziert und die zellulären Carnosin- und Anserin-Konzentrationen per HPLC ermittelt. Um die Bedeutung der CN2 innerhalb des Carnosinstoffwechsels sowie potentielle weitere Rollen dieses Enzyms in Nierenzellen zu klären, wurde mithilfe von siRNA ein CN2-knockdown Zell-Modell etabliert und bezüglich seines Metaboloms, der enzymatischen Aktivität und der Zellviabilität mit einer Kontroll-Zelllinie, behandelt mit nicht-kodogener siRNA, verglichen. Als ein zweiter Ansatz zur Reduktion der Carnosinaseaktivität wurde die Hemmung der CN1 durch Thiole am rekombinanten Enzym sowie im Nierengewebe von Mäusen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Tubulus- und Mesangialzellen sowohl Carnosin als auch Anserin enthalten und die Carnosin metabolisierenden Enzyme Carnosin Synthase (CARNS) und CN1 ebenso wie CN2 exprimieren, wobei die Expression von CNDP2 über 100mal so hoch war wie die Expression der Gene CNDP1 und CARNS. Die Anserinkonzentration in Tubuluszellen war etwa 15mal so hoch wie in Mesangialzellen, während der Carnosingehalt der Zellreihen sich nicht unterschied. Die Ko-inkubation von Tubuluszellen mit H₂O₂ in niedriger Konzentration (0,01 mM) und Anserin führte zu einem signifikanten Anstieg der Hsp70-Expression, während die Hsp70-Expression nach Inkubation dieser Zellen mit Carnosin und H₂O₂ oder H₂O₂, Anserin oder Carnosin allein unverändert blieb.

Eine allosterische Hemmung der CN1 durch Thiole konnte im rekombinanten Enzym und in murinem Nierengewebe gezeigt werden. Die CN1-Aktivität war in Nierengewebe von diabetischen (db/db)-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp erhöht und konnte durch Zugabe von Thiolen in vitro normalisiert und bei Zugabe höherer Konzentrationen reduzierten Glutathions und Cysteins sogar subtotal unterdrückt werden.

Trotz seines Namens „Carnosinase 2“ fanden sich keine Hinweise für eine Beteiligung dieses Enzyms im Carnosinstoffwechsel in Nierenzellen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CN2-knockdown und Kontrollzellen bezüglich Carnosinabbaurate, Carnosin- und Anserinkonzentrationen und Expression von CNDP1 und CARNS festgestellt werden. Rekombinante CN2 baute Carnosin und Anserin auch bei pH 7.5 ab, jedoch lag die Aktivität des Enzyms für die Hydrolyse von Carnosin nur bei 10% der Carnosinabbaurate desselben Enzyms bei pH 9 und nur 20% der Aktivität von rekombinanter CN1 für diese Reaktion.

Eine Analyse des Metabolitenprofils des Aminosäuren- und Zuckerstoffstoffwechsels ergab lediglich eine Verdopplung der Sorbitolkonzentration in CN2-knockdown Tubuluszellen. Sorbitol ist ein Zwischenprodukt des Polyol-Weges, eines Stoffwechselweges, der durch oxidativen Stress und erhöhte Glukose-Konzentrationen im Nierengewebe aktiviert wird und durch die Verstärkung von oxidativem und osmotischem Stress zur Entwicklung der diabetischen Nephropathie beiträgt.

Der Knockdown von CN2 führte zur Anhäufung des Dipeptides Cysteinylglycin (Cys-Gly) in den entsprechenden Nierenzellen. Der Abbau von Cys-Gly in CN2-knockdown Zellen war in Tubuluszellen um 60% und in Mesangialzellen um beinahe 90% reduziert. Die Aktivität der rekombinanten CN2 für den Abbau von Cys-Gly war etwa 800mal höher als für Carnosin als Substrat. Der Abbau von Cys-Gly ist eine Reaktion innerhalb des γ -Glutamyl-Zyklus, einem Stoffwechselweg für Aminosäureaufnahme und Synthese und Abbau von Glutathion. Jedoch ist CN2 nicht geschwindigkeitslimitierend in diesem Zyklus und die Glutathion-(GSH-) Konzentrationen in den CN2-knockdown Zellen waren unverändert.

Die CN2-knockdown Zellen wurden dann oxidativem Stress als Modell für diabetische Stoffwechselbedingungen ausgesetzt. Die Viabilität der CN2-knockdown Tubuluszellen unter oxidativem Stress unterschied sich nicht von den Kontrollen, wohingegen die Viabilität von Mesangialzellen durch den CN2-Knockdown signifikant verbessert wurde. Zudem beeinflusste der oxidative Stress die CN2-Konzentration in den Nierenzellen. In Tubuluszellen wurde die Expression von CNDP2 durch H_2O_2 induziert und in Mesangialzellen reduziert.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass CN2 keine Rolle im Carnosinstoffwechsel der Nierenzellen spielt. Stattdessen wirkt CN2 als Dipeptidase für den Abbau von Cysteinylglycin und ist somit am γ -Glutamyl-Zyklus beteiligt, einem Stoffwechselweg für Abbau und Neusynthese von GSH. Oxidativer Stress beeinflusst zelltypspezifisch die CNDP2-Expression in Nierenzellen, und die Viabilität von

Mesangialzellen unter oxidativem Stress wird durch CN2-knockdown verbessert. Eine Rolle von CN2 in der zellulären Antwort auf oxidativen Stress kann daher postuliert werden und könnte die Korrelation zwischen CNDP2 Polymorphismen und diabetischer Nephropathie erklären.

Weitere Forschung ist notwendig, um die genauen Wirkmechanismen von CN2 in der oxidativen Stressantwort und ihre Bedeutung für die Nephroprotektion in vivo und als mögliches therapeutisches Ziel bei Diabetikern zu klären.

Carnosine and anserine are histidine-containing dipeptides with antioxidant and nephroprotective properties that are naturally present in muscle, brain and kidney. Two dipeptidases in humans possess the ability to degrade carnosine and anserine, carnosinase 1 (CN1) and carnosinase 2 (CN2). Whereas CN1 specifically cleaves carnosine and closely related dipeptides, the role of CN2 *in vivo* is debated, especially since the pH optimum for carnosine degradation is in the far the alkaline range. Several genome-wide linkage studies have shown a correlation between polymorphisms in the gene loci of carnosinase 1 and carnosinase 2 (CNDP1 and 2) and the risk of developing diabetic nephropathy.

The aim of this dissertation was to further characterize the intrinsic carnosine metabolism of renal cells and the importance of the carnosinases 1 and 2. To this end, mesangial (Mes 13) and tubular cells (HK2) were cultured, the expression of carnosine metabolizing enzymes was determined by qPCR and western blot, enzymatic carnosine degradation quantified by a fluorescence-based enzymatic assay and cellular carnosine and anserine concentrations measured by HPLC. To determine the importance of CN2 within the carnosine metabolism as well as a potential further role of this enzyme in kidney cells, an siRNA mediated CN2 knockdown cell model was established and compared to non-targeting siRNA control cell lines in terms of metabolome, enzymatic activity, viability and resistance to oxidative stress. As a second approach to the reduction of carnosinase activity, the inhibition of recombinant CN1 and mouse renal tissue CN1 by thiols was studied.

The results of this work demonstrate that tubular and mesangial cells contain both carnosine and anserine and express the carnosine metabolizing enzymes carnosine synthase (CARNS) and CN1 as well as CN2. The expression of CNDP2 was more than 100-fold higher than the expression of CNDP1 and CARNS, and anserine was found in a 15-fold higher concentration in tubular cells than in mesangial cells, whereas carnosine concentrations did not differ between cell lines. Co-incubation of tubular cells with a low concentration of H₂O₂ (0.01mM) and anserine resulted in a significant increase in heat shock protein 70 (Hsp70) expression, whereas Hsp70 expression was not altered by co-incubation with carnosine and H₂O₂ or treatment with H₂O₂, anserine or carnosine alone.

CN1 activity could effectively be reduced by allosteric inhibition with thiol-containing compounds in recombinant enzyme and mouse kidney tissue. *Ex vivo* kidney CN1 activity of db/db mice was higher than in respective wildtype controls and could be normalized by addition of thiols and even subtotally suppressed with high doses of reduced glutathione and cysteine.

Despite its name “carnosinase 2”, there was no evidence for an involvement of CN2 in carnosine metabolism in kidney cells. No significant difference could be detected between CN2 knockdown and control cells in terms of carnosine degradation rate, carnosine and anserine concentrations and expression of CNDP1 and CARNS. Recombinant CN2 hydrolyzed carnosine and anserine at pH 7.5, its

activity however was only 10% of its carnosine degradation rate at pH 9 and only 20% of the activity of recombinant CN1.

Amino acid and glucose metabolite profiling in tubular CN2 knockdown cells demonstrated a significant, twofold increase in sorbitol concentrations. Sorbitol is an intermediate of the polyol pathway, which is activated in kidney tissue by oxidative stress and high glucose levels and contributes to diabetic nephropathy by enhancing oxidative and osmotic stress.

CNDP2 knockdown led to an accumulation of the dipeptide cysteinylglycine (Cys-Gly). The Cys-Gly-degradation rate in the CN2 knockdown cells was diminished by about 60% in tubular and almost 90% in mesangial cells. Recombinant CN2 showed an about 800-fold higher activity for the substrate Cys-Gly than for carnosine. The degradation of Cys-Gly is a reaction within the γ -glutamyl-cycle, a pathway for the uptake of amino acids and the synthesis and degradation of glutathione. However, CN2 was not rate limiting in this cycle, and glutathione (GSH) concentrations in CN2 knockdown cells were not altered.

The CN2 knockdown cells were then exposed to oxidative stress, one pathomechanism of diabetic conditions. The viability of tubular CN2 knockdown cells under oxidative stress, i.e. exposure to H_2O_2 , did not differ from controls, whereas mesangial cell viability was significantly improved by CN2 knockdown. Additionally, CN2 expression was induced by H_2O_2 in tubular cells and reduced in mesangial cells.

Taken together, this work demonstrates that mesangial and tubular cells both have an intrinsic carnosine metabolism, but that CN2 is not essentially involved in this carnosine metabolism. Instead, CN2 acts as a dipeptidase for the degradation of cysteinylglycine and is thereby part of the γ -glutamyl-cycle, a pathway for degradation and *de-novo*-synthesis of GSH. Oxidative stress cell-type-specifically impacts on renal CNDP2 expression, and viability of mesangial cells under oxidative stress is ameliorated by CN2 knockdown. A role of CN2 in cellular response to oxidative stress can therefore be hypothesized and may explain the correlation between CNDP2 polymorphisms and diabetic nephropathy. Further research is required in order to clarify the exact mechanism of CN2 action in oxidative stress response and its importance *in vivo* as a potential nephroprotective mechanism that could be targeted in diabetic patients.