Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Über den Einfluss des Hyperglykämie-assoziierten Metaboliten Methylglyoxal auf humane Endothelzellen und das protektive Potenzial von L-Carnosin

Autor: Jana Dorothea Braun
Institut / Klinik: V. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. B. Yard

Der Diabetes mellitus stellt eine der größten medizinischen Herausforderungen dieses Jahrhunderts dar. Von großer Bedeutung sind hierbei diabetische Spätfolgen, die nicht nur zu einer enormen gesundheitsökonomischen Belastung führen, sondern auch mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität einhergehen. Dem durch die chronische Hyperglykämie dysregulierten und geschädigten, vaskulären Endothel wird in der Pathogenese diabetischer Spätfolgen eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Das reaktive Carbonyl Methylglyoxal (MGO) kann die Entstehung von Advanced Glycation End-Products fördern, die als entscheidende Mediatoren bei der Entwicklung und Progression diabetischer Spätfolgen gelten. Gleichzeitig wird von einer Diabetes-assoziierten, latenten und chronisch verlaufenden Entzündungsreaktion ausgegangen, welche die Entstehung der Spätkomplikationen zusätzlich begünstigen kann. Hierbei wird insbesondere dem pro-inflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) eine wichtige Rolle zugeschrieben. TNF-α ist unter anderem in der Lage, die Expression von Adhäsionsmolekülen wie dem „Vascular Cell Adhesion Molecule-1“ (VCAM-1) zu induzieren. Um diese Entzündungsreaktion *in vitro* zu simulieren, wurden Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) im Rahmen dieser Promotionsarbeit mit TNF-α stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen verschiedenen MGO-Konzentrationen ausgesetzt und die Auswirkungen auf das zelluläre Transkriptom untersucht. In einem weiteren Ansatz wurde ein möglicher Einfluss von L-Carnosin, einem natürlichen Dipeptid mit anti-diabetischem Potenzial, hinsichtlich MGO- und TNF-α-induzierter Effekte beleuchtet.
Hierfür wurden HUVECs für 24 Stunden mit TNF-α (12,5 ng/ml) ± MGO (400 µM oder 800 µM) ± L-Carnosin (20 mM) inkubiert und nach Isolation der RNA eine genomweite Expressionsanalyse mittels Microarrays durchgeführt. Die Inkubation mit 800 µM MGO führte zu einer signifikanten Änderung des Genexpressionsprofils, wobei deutlich mehr Gene in ihrer Expression inhibiert als induziert wurden. Unter den am stärksten supprimierten Genen fanden sich insbesondere Zellzyklus-abhängige Gene. Das quantitativ am stärksten induzierte Gen stellte das Enzym Hämoxygenase-1 (HO-1) dar. Der Effekt von MGO auf die HO-1-Expression wurde mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) und Western Blot bestätigt. Beim Vergleich der Inkubationsbedingungen TNF-α + 800 µM MGO versus TNF-α identifizierte die KEGG-Signalweganalyse („Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“- Datenbank) sechs signifikant angereicherte Signalwege. Hierbei zeigte sich insbesondere eine Anreicherung von Genen, die im p53-Signalweg involviert sind. Gleichwohl ergab sich keine signifikante Assoziation inflammatorischer Signalwege. Auf Proteinebene gelangte eine Hemmung der TNF-α-induzierten VCAM-1-Expression durch 800 µM MGO zur Darstellung. L-Carnosin wirkte den MGO-induzierten transkriptionellen Veränderungen signifikant entgegen. Hierbei stellte HO-1 das am stärksten beeinflusste Gen dar, wobei L-Carnosin die durch MGO gesteigerte HO-1-Expression inhibierte. Validiert wurde dieses Ergebnis mittels qPCR und Western Blot. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Inkubation TNF-α-stimulierter HUVECs mit 800 µM MGO insbesondere die Expression von Zellzyklus-relevanten Genen beeinflusst. Tatsächlich konnte L-Carnosin unter den gewählten Bedingungen einen signifikanten Anteil der MGO-vermittelten Effekte antagonisieren. Eine Aggravation der TNF-α-induzierten Entzündungsreaktion durch eine Ko-Inkubation mit MGO konnte weder mittels Signalweganalyse noch über eine Bestimmung der Proteinexpression des Inflammationsmarkers VCAM-1 festgestellt werden. Die vorliegende Arbeit trägt zum Verständnis der MGO-induzierten Endothelschädigung bei und unterstreicht das protektive Potenzial von L-Carnosin zur Behandlung und Prävention diabetischer Komplikationen.