

Benjamin Andreas Singler

Dr. med.

Protektive Effekte von Carnosin in renalen Zellen unter diabetischen Bedingungen

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Claus Peter Schmitt

Eine genetische determinierte geringe Aktivität der Carnosin degradierenden Carnosinase-1 ist bei Diabetikern mit einer geringeren Inzidenz der diabetischen Nephropathie assoziiert. Bei Nagern wirkt exogenes Carnosin nephroprotektiv. Unklar ist, welche zellulären und molekularen Mechanismen diesen Effekten zugrunde liegen. Der Carnosin-Metabolismus renaler Zellen ist zellspezifisch ungenügend untersucht. Unbekannt ist auch, inwieweit in der menschlichen Niere ein intrinsischer Carnosin-Metabolismus vorhanden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Carnosin-Metabolismus von proximalen Tubuluszellen, Podozyten, Endothelzellen und Mesangialzellen *in vitro* untersucht. Des Weiteren wurden potentielle protektive Effekte von Carnosin und Anserin auf kultivierte Nierenzellen unter Bedingungen des diabetischen Milieus anhand der Zellviabilität analysiert. Hierzu wurden diabetische Stressbedingungen durch Hyperglykämie, Methylglyoxal und reaktive Sauerstoff-Spezies induziert. Quantifiziert wurden darüber hinaus die Superoxiddismutase-Aktivität und die Konzentration an reduziertem Glutathion sowie die Proteinmodifizierung und der zelluläre Glukoseverbrauch.

In proximalen Tubuluszellen und Podozyten konnte ein Carnosin-Metabolismus nachgewiesen werden. Die Aktivität und die Proteinkonzentration der Carnosinase-1 waren in Tubuluszellen und Podozyten in einem vergleichbaren Bereich. Podozyten verfügten über die höchste Expression der Carnosinase-1 und der Carnosinsynthase sowie über die höchsten Carnosin- und Anserin-Konzentrationen. In Endothelzellen waren die Expressionen und Konzentrationen von Carnosinase-1 und Carnosinsynthase gering sowie Carnosin und Anserin nicht nachweisbar. Sie wurden deshalb nicht weiter untersucht. Auch in Mesangialzellen konnten Carnosin und Anserin nachgewiesen werden.

Die diabetischen Stressfaktoren Hyperglykämie, Methylglyoxal und reaktive Sauerstoff-Spezies reduzierten die Viabilität von Tubuluszellen, Podozyten und Mesangialzellen. Geringe Methylglyoxal-Konzentrationen führten bei Tubuluszellen und Podozyten und Hyperglykämie bei Mesangialzellen zu einem Anstieg der Zellviabilität. Carnosin und Anserin waren in hohen Konzentrationen unter nicht diabetischen Bedingungen *in vitro*

zytotoxisch. Lediglich Podozyten wiesen nur bei extrem hohen Carnosin-Konzentrationen eine Beeinträchtigung der Zellviabilität auf. Bei Inkubation über 48 Stunden konnten unabhängig vom Zelltyp keine protektiven Effekte von Carnosin und Anserin nachgewiesen werden, das heißt die Viabilität der renalen Zellen wurde durch Zugabe von Carnosin und Anserin bei Inkubation mit Hyperglykämie, Methylglyoxal beziehungsweise reaktiven Sauerstoff-Spezies nicht verbessert. Bei prolongierter Exposition über 7 Tage war ein leicht protektiver Effekt von Carnosin bezüglich der Viabilität von Tubuluszellen unter Hyperglykämie nachweisbar. Bei Tubuluszellen und Mesangialzellen war nur in einzelnen Ansätzen eine Protektion der Zellviabilität vor Methylglyoxal durch gleichzeitige Gabe von Carnosin über 7 Tage zu beobachten. Darüber hinaus führten weder Carnosin noch Anserin bei Koinkubation über 7 bzw. 14 Tage mit Methylglyoxal und reaktiven Sauerstoff-Spezies zur Verbesserung der Viabilität von Tubuluszellen, Podozyten und Mesangialzellen. Erfolgte jedoch eine Präkonditionierung von Tubuluszellen mit Carnosin über 10 Tage, war ein Schutz vor Methylglyoxal induzierter Hemmung der Zellviabilität nachweisbar. Diese protektiven Effekte der prolongierten Präkonditionierung mit Carnosin sind möglicherweise durch eine langsame zelluläre Aufnahme von Carnosin bedingt. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Tubuluszellen und Mesangialzellen unter Standardkulturbedingungen *in vitro* nur geringe Mengen an Carnosin und Podozyten kein Carnosin aufnahmen. Carnosin und Anserin besaßen *in vitro* keinen Einfluss auf die Superoxiddismutase-Aktivität, die Konzentration an reduziertem Glutathion, die Proteincarbonylierung, die Konzentration an Carboxyethyl-Lysin und den Glukoseverbrauch.

Die vorliegenden *in vitro* Studien konnten einen zellspezifischen Carnosin-Metabolismus, eine langsame Aufnahme von Carnosin in Tubulus- und Mesangialzellen und entsprechend einen Schutz vor durch den reaktiven Metaboliten Methylglyoxal induzierte Zytotoxizität nur nach entsprechend langer Vorbehandlung der Zellen mit Carnosin nachweisen. Dieser direkte zytoprotektive Effekt könnte die Grundlage für die renale Zytoprotektion von Carnosin *in vivo* darstellen. Es konnten jedoch keine zellulären Mechanismen, wie eine Beeinflussung antioxidativer Systeme, identifiziert werden, die der Zytoprotektion *in vitro* oder der berichteten Nephroprotektion *in vivo* zugrunde liegen könnten. In zukünftigen Arbeiten sollte durch Ausschaltung der Carnosinase-1 und Überexprimierung der Carnosinsynthase Veränderungen des Carnosin-Metabolismus im Zellmodell sensitiver und spezifischer untersucht werden. Weitere zelluläre Mechanismen sollten analysiert werden, insbesondere die Regulation des Zellzyklus und unter diabetischen Bedingungen aktivierte Signalwege und veränderte Proteinmetabolismen. Dabei sollte die verzögert einsetzende Wirkung von

Carnosin berücksichtigt werden. Aktuell wird von unserer Arbeitsgruppe ein renales Carnosinase-1-Knock-out-Mausmodell analysiert, um die Bedeutung des renalen Carnosin-Metabolismus für die Entwicklung und Progredienz der diabetischen Nephropathie zeigen und die Rationale für entsprechende Studien an Patienten mit Diabetes erhalten zu können.