

INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

Vorgelegt von: Tim Weigand  
Tag der mündlichen Prüfung:

# Molekulare und metabolische Auswirkungen eines Carnosinase 1-Knockouts im Mausmodell

Gutachter: Prof. Dr. Markus Hecker  
Prof. Dr. Marc Freichel

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	5
2.1. Carnosin und Anserin .....	5
2.2. Chemische Eigenschaften von Carnosin und Anserin .....	6
2.3. Synthese von Carnosin und Anserin.....	8
2.4. Abbau von Carnosin und Anserin.....	9
2.5. Carnosin und diabetische Nephropathie .....	10
2.5.1. Diabetische Nephropathie .....	10
2.5.2. Therapeutisches Potenzial von Carnosin .....	12
2.6. Zielsetzung.....	16
3. Material und Methoden.....	17
3.1. Material .....	17
3.1.1. Chemikalien.....	17
3.1.2. Kits und Standards.....	19
3.1.3. Enzyme und Lösungen.....	19
3.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze.....	19
3.1.5. Puffer.....	20
3.1.6. Geräte.....	21
3.1.7. Primer.....	23
3.1.8. Zellen der <i>in vitro</i> -Versuche .....	24
3.2. Methoden.....	24
3.2.1. Versuchstiere.....	24
3.2.2. Zellkultur .....	30
3.2.3. Molekularbiologische Methoden .....	33
3.2.4. Statistische Auswertung.....	40
4. Ergebnisse .....	40
4.1. Rolle und Funktionalität des renalen Carnosinmetabolismus und dessen Veränderungen in Mäusen mit einem globalen <i>Cndp1</i> -Knockout.....	40
4.1.1. Carnosinase-Aktivität .....	40
4.1.2. Carnosin- und Anserinkonzentrationen .....	43
4.1.3. Lokalisierung von Carnosin und Anserin in der Niere.....	49
4.2. Funktionalität und Morphologie der Niere bei globaler <i>Cndp1</i> -Defizienz.....	50
4.2.1. Glomeruläre Filtrationsrate .....	50
4.2.2. Urinäre Albumin- und Creatininspiegel .....	51
4.2.3. Histologische Färbungen .....	52
4.2.4. Aminosäure-Konzentrationen.....	53

4.3. Wirkungsmechanismen von Carnosin und Anserin auf Carbonyl- und oxidativen Stress <i>in vitro</i> .....	56
4.3.1. Interaktion von Carnosin und Anserin mit Methylglyoxal .....	56
4.3.2. Effekt von Carnosin und Anserin auf Proteinmodifikationen durch Methylglyoxal.....	57
4.3.3. Expression der Gene der Carnosintransporter in renalen Zellen .....	59
4.3.4. Einfluss von Carnosin und Anserin auf renale Zellen .....	60
4.3.5. Effekt von Carnosin auf Proteinmodifikationen durch Carbonylstress in renalen Zellen .....	60
4.3.6. Effekt von Carnosin und Anserin auf die <i>HSPA1</i> -Expression bei oxidativem und Glukosestress.....	61
4.4. Protektive Mechanismen und Indikatoren von Carbonyl- und oxidativem Stress in der Niere bei <i>Cndp1</i> -Defizienz.....	62
4.4.1. Glutathionmetabolismus in der Niere .....	62
4.4.2. Genexpressionsanalyse in der Niere .....	64
4.4.3. Proteinoxidation in der Niere.....	64
4.5. Basaler Phänotyp der <i>Cndp1</i> -Knockoutmäuse.....	65
4.5.1. Körpergewicht .....	65
4.5.2. Organgewichte .....	67
4.5.3. Glukosehomöostase.....	71
5. Diskussion.....	78
5.1. Die renale Carnosinase-Aktivität ist in den <i>Cndp1</i> -Knockoutmäusen de facto ausgeschaltet.....	78
5.2. Die renalen Konzentrationen von Carnosin und Anserin sind in den <i>Cndp1</i> -Knockoutmäusen erhöht .....	79
5.3. Die Carnosin- und Anserinkonzentration in anderen Organen der <i>Cndp1</i> -Knockoutmäuse sind kaum verändert .....	81
5.4. Die Funktionalität und Morphologie der Niere ist in <i>Cndp1</i> -Knockoutmäusen unverändert.....	84
5.5. Indikatoren für Schutzmechanismen vor Carbonyl- und oxidativem Stress sind in den Nieren der <i>Cndp1</i> -Knockoutmäuse verändert .....	87
5.6. Das Körper- und die Organgewichte der <i>Cndp1</i> -Knockoutmäuse sind erhöht...	91
5.7. Die Glukosehomöostase in den <i>Cndp1</i> -Knockoutmäusen ist verändert .....	92
5.8. Limitationen und Ausblick.....	93
6. Literatur.....	95
7. Eigene Publikationen.....	107

## Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
°C	Grad Celsius
$\delta$	chemische Verschiebung
A	Ampere
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ACR	<i>albumin creatinine ratio</i> ; Albumin-Creatinin-Quotient
AGE	<i>advanced glycation endproduct</i>
AGXT2	Alanin-glyoxylat-transaminase
Ala	Alanin
ARB	Angiotensinrezeptor-Blocker
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
BocLys	N <sup>ε</sup> -(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
CASI	<i>continuous accumulation of selected ions</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CML	Carboxymethyllysin
CN1	Carnosinase 1
<i>CNDP1</i>	Gen der humanen Carnosinase 1
<i>Cndp1</i>	Gen der murinen Carnosinase 1
<i>Cndp1</i> -KO	Knockoutout des <i>Cndp1</i> -Gens
COSY	correlated spectroscopy, Korrelationsspektroskopie
Ct	<i>threshold cycle</i> , Fluoreszenzschwellenwert
Da	Dalton ( $1,66053892 \cdot 10^{-27}$ kg)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DKD	<i>diabetic kidney disease</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ESRD	<i>end stage renal disease</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	<i>g force</i> , Erdbeschleunigung
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GABA-T	4-Aminobutyrat-2-oxoglutarat-Transaminase
GAMM	<i>generalized additive mixed model</i>
GCLC	<i>Glutamate cysteine ligase catalytic subunit</i>
GCMC	<i>Glutamate cysteine ligase modifier subunit</i>
GCS	$\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase
<i>Gcs</i>	Gen der GCS
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
<i>Gpx1</i>	Gen der Glutathionperoxidase 1
GPX1	Glutathionperoxidase 1
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Stunde
HbA1c	glykiertes Hämoglobin
HDP	Histidindipeptid
HE	Hematoxylin und Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HNMT-like	<i>histamine N-methyltransferase-like</i>
HO-1	Hämoxygenase-1
<i>Ho-1</i>	Gen der HO-1
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP70	70 kilodalton Hitzeschockprotein

<i>HSPA1</i>	Gen des humanen Hitzeschockproteins 70
<i>Hspa1</i>	Gen des murinen Hitzeschockproteins 70
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Ile	Isoleucin
<i>Nos2</i>	Gen der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase
ITO	<i>indium tin oxide-coated</i> , Indium-Zinnoxid beschichtet
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	Meter
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MALDI-MS	Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektroskopie
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDA	Malondialdehyd
Met	Methionin
MG	Methylglyoxal
MG-H1	<i>Methylglyoxal-derived hydroimidazolone</i> , Methylglyoxaladdukt Hydroimidazolone
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MSI	<i>Mass Spectrometry Imaging</i>
n	Stichprobenumfang
<i>Nfe2l2</i>	Gen des NRF2
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
NQO1	<i>NAD(P)H dehydrogenase (quinone) 1</i>
<i>Nqo1</i>	Gen der NQO1
NRF2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
ODC	Ornithindecaboxylase
Orn	Ornithin
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PAS	<i>periodic acid–Schiff reaction</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline with Tween20</i> , Phosphate gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEPT1	Peptidtransporter 1
PEPT2	Peptidtransporter 2
PHT1	Mitglied der Protonen gekoppelten Oligopeptidtransporter

PHT2	Mitglied der Protonen gekoppelten Oligopeptidtransporter
pK <sub>s</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
ppm	<i>parts per million</i> , Anteile pro Million
Pro	Prolin
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerasekettenreaktion
qTof	<i>quadrupole time-of-flight</i> , Quadrupol-Flugzeitanalyse
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SFOG	Säurefuchsin-Orange-G-Färbung
SLC	<i>solute carrier family</i>
SOD	Superoxiddismutase
STZ	Streptozotocin
T <sub>2</sub>	<i>transverse relaxation</i> , transversale Relaxation
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TauT	Taurintransporter
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>Tgfβ</i>	Gen des <i>transforming growth factor beta</i> , transformierenden Wachstumsfaktor beta
<i>Tnfa</i>	Gen des Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TXNIP	<i>Thiorexodin interacting protein</i>
Tyr	Tyrosin
U	<i>unit</i> , Einheit
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
V	Volt
Val	Valin
vs.	versus
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen per Volumen
willk.	willkürlich
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht per Volumen



## 1. Zusammenfassung

Eine protektive Wirkung von Carnosin und seines Derivats Anserin gegen Diabetes mellitus und diabetische Spät komplikationen wie die diabetische Nephropathie wurde in zahlreichen Zell- und Mausmodellen gezeigt, ohne den zugrundeliegenden Mechanismus zu verstehen. Teilweise kontrovers diskutiert werden unterschiedliche lokale renale Schutzmechanismen wie eine anti-oxidative Wirkung oder das Abfangen und Inaktivieren verschiedener reaktiver Metabolite. In vielen, aber nicht allen, Studien mit diabetischen Tieren konnte auch ein systemischer Effekt mit einer verbesserten Glukosehomöostase gezeigt werden.

Aus diesem Grund wurden Untersuchungen in einem Mausmodell mit einem Knockout des für das Carnosin abbauende Enzym Carnosinase 1 kodierenden Gens (Enzym: CN1; Gen: *Cndp1*) durchgeführt. In Wildtypmäusen konnte eine Carnosin abbauende Aktivität ausschließlich in der Niere gemessen werden, jedoch nicht im Gehirn, in der Leber, im Muskel, im Herz, in den Lungen, im Serum oder im Pankreas. Der dadurch quasi nierenspezifische homozygote Knockout des *Cndp1*-Gens erwies sich somit als weitgehend ideales Modell zur Untersuchung der Bedeutung des renalen Carnosinmetabolismus im Hinblick auf die Funktionalität und Morphologie der Nieren, nephroprotektive Systeme und anderer potenzielle Schutzmechanismen gegen den Diabetes mellitus bzw. die diabetische Nephropathie.

In homozygoten *Cndp1*-defizienten Mäusen war die renale Carnosinase 1-Aktivität praktisch ausgeschaltet und nur bei supraphysiologisch hohen Substratkonzentrationen konnte *ex vivo* eine unspezifische Carnosin abbauende Restaktivität durch das Enzym Carnosinase 2 im Nierengewebe dieser Tiere detektiert werden. Die renalen Konzentrationen von Carnosin und Anserin waren in den *Cndp1*-Knockoutmäusen verglichen mit den Wildtypmäusen stark erhöht. Unterschiede zwischen den Geschlechtern waren vorhanden, doch gering ausgeprägt. Carnosin und Anserin waren hauptsächlich im renalen Cortex lokalisiert und die Konzentrationen nahmen mit dem Alter ab. In den anderen untersuchten Organen wurde keine Konzentrationszunahme und im Muskelgewebe sogar eine Abnahme der Carnosin- und Anserinkonzentration gemessen.

Sowohl im Zell- als auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Carnosin und Anserin Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress und chronische Entzündung im Nierengewebe beeinflussen. Während der Glutathionmetabolismus durch den *Cndp1*-Knockout und die damit verbundenen erhöhten Carnosin- und Anserinkonzentrationen nicht beeinflusst war, war die Expression pro-inflammatorischer und zytoprotektiver Gene in der Niere der *Cndp1*-Knockoutmäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen altersabhängig verändert. In den jungen (11 Wochen) *Cndp1*-Knockoutmäusen war die Expression von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* erhöht, in den alten (55 Wochen) *Cndp1*-Knockoutmäusen relativ zu den Wildtypmäusen erniedrigt. In humanen Tubulusepithelzellen *in vitro* erhöhte eine Inkubation mit Anserin die Expression des für das Hitzeschockprotein 70 kodierenden Gens, was im Tiermodell bestätigt werden konnte.

Die Interaktion des für die diabetische Nephropathie bedeutenden reaktiven Carbonyls Methylglyoxal mit Carnosin konnte in zellfreier Umgebung nachgewiesen werden. Carnosin fungierte dabei als Katalysator der Bildung hochmolekularer Methylglyoxal-Oligomere und -Polymere. Methylglyoxal-Carnosin-Addukte hatten nur eine sehr kurze Halbwertszeit und konnten deshalb nicht charakterisiert werden. Carnosin und Anserin reduzierten die Bildung von *advanced glycation endproducts* durch Methylglyoxal, jedoch ausschließlich in sehr hohen Konzentrationen relativ zu der von Methylglyoxal. Vermutlich aus diesem Grund konnte dieser Effekt in kultivierten humanen Tubulusepithelzellen nicht reproduziert werden. Im Nierengewebe 11 und 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse war die Proteinoxidation im Vergleich zu den Wildtypmäusen ebenfalls unverändert.

Der postulierte Effekt von Carnosin und Anserin auf die Glukosehomöostase konnte bestätigt und auch näher charakterisiert werden. Während die Insulinsensitivität hauptsächlich vom Geschlecht und nicht vom Genotyp abhängig war, so war in den jungen (11 Wochen) *Cndp1*-Knockoutmäusen der Nüchternblutzuckerspiegel im Vergleich zu den Wildtypmäusen erniedrigt. Dies korrelierte mit einer Reduktion der Konzentration von Glutamin, dem wichtigsten Substrat der renalen Glukoneogenese. Die Körper- und Organgewichte unterschieden sich in den jungen *Cndp1*-Knockoutmäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen nicht. In alten (55 Wochen) *Cndp1*-Knockoutmäusen wiederum war der Nüchternblutzuckerspiegel im Vergleich zu

Wildtyptieren erhöht, ebenso wie das Körpergewicht und das Gewicht aller Organe außer der Lunge. Da jedoch Futteraufnahme und Energieumsatz nicht bestimmt wurden, bleiben die Mechanismen der erhöhten Gewichtszunahme offen.

Auch wenn in diesem Mausmodell die Nierenfunktion, repräsentiert durch die glomeruläre Filtrationsrate und das Albumin-zu-Creatinin-Verhältnis sowie die Nierenmorphologie nicht verändert waren, zeigten diese Ergebnisse im Tier- und Zellmodell protektive Auswirkungen von Carnosin und Anserin. Die renal erhöhten Carnosin- und Anserinkonzentrationen in den *Cndp1*-Knockoutmäusen haben nicht nur lokale Effekte in den Nieren, sondern auch einen systemischen Einfluss, indem sie die Glukosehomöostase und das Körpergewicht verändern. Ein Schutz durch diese Steigerung der Carnosin- und Anserinkonzentrationen in den Nieren bei der Entstehung einer diabetischen Folgeerkrankung ist somit denkbar und Gegenstand weiterer Untersuchungen.

## **1. Summary**

The protective effects of carnosine and its derivative anserine against diabetes mellitus and diabetic sequelae such as diabetic nephropathy have been demonstrated in numerous cell and animal models without a clear understanding of the underlying mechanisms. Local renal effects of carnosine and anserine, such as anti-oxidative activity or quenching and inactivation of reactive metabolites are a matter of controversy. Additionally, a systemic impact on glucose homeostasis has been shown in many studies with diabetic animals.

Therefore, a mouse model with a knockout of the gene of the carnosine degrading enzyme carnosinase 1 (enzyme: CN1; gene: *Cndp1*) was characterised. In wildtype mice, carnosine degrading activity was solely found in the kidney, but not in the brain, liver, muscle, heart, lungs, serum or pancreas. This effectively kidney-specific homozygous knockout of the *Cndp1*-gene proves to be the ideal model for studies into the importance of the renal carnosine metabolism focussing on kidney function and morphology, nephroprotective systems and other protective mechanisms against diabetes mellitus and diabetic nephropathy.

In homozygous *Cndp1*-deficient mice renal CN1 activity was practically abolished and only under supra-physiologically high substrate concentrations was unspecific carnosine degrading activity by carnosinase 2 detected in the renal tissue of these mice *ex vivo*. Renal concentrations of carnosine and anserine were heavily increased in *Cndp1*-knockout mice compared to wildtype controls. Differences between sexes were present, but minor. Carnosine and anserine were mainly localised in the kidney cortex and concentrations decreased with age. In all other tissues, carnosine and anserine concentrations did not increase. In muscle tissue, carnosine and anserine concentrations declined in *Cndp1*-knockout mice.

In cell culture as well as in the mouse model, some influence of carnosine and anserine on protective mechanisms against oxidative stress and chronic inflammation in renal tissue could be demonstrated. Whereas glutathione metabolism was not affected by *Cndp1*-knockout, expression of pro-inflammatory and cytoprotective genes in kidney tissue of *Cndp1*-knockout mice was age-dependently altered in comparison to wildtype mice. In young *Cndp1*-knockout mice (11 weeks), expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 was increased, but was decreased in old *Cndp1*-knockout mice (55 weeks) relative to wildtype animals. In human tubular cells, incubation with anserine increased expression of the gene of heat shock protein 70 *in vitro*. This could be reconfirmed in the *Cndp1*-knockout mouse model.

The interaction of methylglyoxal, a reactive carbonyl implicated in the progression diabetic nephropathy, with carnosine could be demonstrated in a cell-free environment. Carnosine functioned as catalysing agent for the formation of high-molecular methylglyoxal oligomers and polymers. The methylglyoxal adducts had very short half-lives, thus could not be further analysed. Carnosine and anserine reduced the formation of advanced glycation end-products by methylglyoxal, but only in very high concentrations relative to methylglyoxal. Therefore, this effect could not be reproduced in cultured human tubular cells. Likewise, in the renal tissue of 11- and 55-week-old *Cndp1*-knockout mice, protein oxidation was unchanged compared to wildtype mice.

The putative effects of carnosine and anserine on glucose homeostasis could be confirmed and characterised in detail. Whereas insulin sensitivity was mainly dependent on gender and not on genotype, in young *Cndp1*-knockout mice (11 weeks), fasting

blood glucose was decreased compared to wildtype mice. This correlated with diminished renal concentration of glutamine, the major substrate of gluconeogenesis in the kidney. Body and organ weights did not differ between *Cndp1*-knockout mice and wildtype controls in young animals. In old *Cndp1*-knockout mice (55 weeks), fasting blood glucose as well as body weight and weight of all organs, except lungs, was increased. Since food and energy consumption were not documented, the mechanisms of increased body weight gain remain uncertain.

Even though, kidney function, represented by the glomerular filtration rate and albumin to creatinine ratio, as well as renal morphology, was unchanged in the *Cndp1*-knockout mouse, the results indicated protective actions of carnosine and anserine in cell culture and the animal model. Increased renal concentrations of carnosine and anserine in *Cndp1*-knockout mice did not only have local impact on the kidney, but a systemic influence on glucose homeostasis and body weight. Thus, the protective effects of increased concentrations of carnosine and anserine in the kidney on the development of late complications of diabetes seem plausible and will be the subject of future studies.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Carnosin und Anserin**

Carnosin ( $\beta$ -Alanyl-L-histidin) ist ein Dipeptid bestehend aus  $\beta$ -Alanin und L-Histidin [1]. Anserin ( $\beta$ -Alanyl-N1-methyl-L-histidin) [2] und Balenin/Ophidin ( $\beta$ -Alanyl-N3-methyl-L-histidin) [3] sind methylierte Derivate des Carnosins mit dem Unterschied in der Methylierung des N $\pi$  bzw. des N $\tau$  Stickstoffatoms des Imidazolrings des L-Histidins. Diese Moleküle werden der Gruppe der Histidindipeptide (HDPs) zugeordnet [4]. Weitere relevante HPDs stellen Homocarnosin ( $\gamma$ -Aminobutyryl-L-histidin) und Homoanserin ( $\gamma$ -Aminobutyryl-methyl-L-histidin) dar, die aus  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) statt  $\beta$ -Alanin gebildet werden [5]. Das Vorkommen dieser HDPs konnte nur für Vertebraten gezeigt werden, in Invertebraten, wie auch Pflanzen und Pilzen werden sie vermutlich nicht synthetisiert [6]. Carnosin ist das am besten erforschte HDP. Es wurde zuerst im Skelettmuskel entdeckt [7] und weist in vielen Organismen in diesem Gewebe die höchste Konzentration auf [8]. Verschiedene Taxa zeichnen sich durch Unterschiede in der Zusammensetzung der HDPs aus. Im Menschen findet sich ausschließlich Carnosin in der Muskulatur und kein Anserin [9]. Im murinen Muskel wurde sowohl Carnosin als

auch Anserin nachgewiesen [10]. Im Muskelgewebe von marinen Säugern, den *Balaenoptera*, ist entsprechend des Namens Balenin in höchster Konzentration vertreten [11], während bei Vögeln Anserin im Muskel in größter Abundanz vorliegt, jedoch kein Carnosin [12]. Verschiedene Gewebe einer Spezies unterscheiden sich auch in den Konzentrationen und Verhältnissen der HDPs zueinander. Während etwa im menschlichen Gehirn eine hohe Carnosinkonzentration gemessen wurde und Anserin nicht detektiert wurde [13], liegt in der humanen Niere Anserin in etwa 2-fach höherer Konzentration als Carnosin vor [14, 15]. In der Maus konnten HDPs nicht nur im Muskel, sondern auch in Gehirn [16], Leber [17], Niere [15], Milz [18] und Pankreas [19] gemessen werden. Auch im murinen Serum wurde Carnosin festgestellt [20, 21], was einen bedeutenden Unterschied zum Menschen darstellt, bei dem die Serumkonzentrationen unterhalb des Detektionslimits liegen [22].

## **2.2. Chemische Eigenschaften von Carnosin und Anserin**

Zu den beschriebenen Eigenschaften von Carnosin gehört eine hohe Pufferkapazität [23], die möglicherweise auch die hohen Konzentrationen der HDPs in der Muskulatur erklärt. Es wird diskutiert, ob die unter mittlerer bis hoher Belastung auftretende Übersäuerung der Muskulatur [24] und der einhergehende Leistungsabfall potenziell durch Puffern des pH-Werts durch Carnosin verhindert werden könnten [25, 26]. Dies geschieht vermutlich über den Imidazolring des L-Histidins mit einem  $pK_s$ -Wert von 6,72 [27], während die Carboxylgruppe ihre maximale Pufferkapazität bei pH 2,76 und die Aminogruppe des  $\beta$ -Alanin bei pH 9,32 besitzen [28]. Auch die Chelatierung von Metallionen wie  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  konnte für Carnosin und Anserin gezeigt werden [29, 30]. Am umfassendsten ist die Komplexbildung des  $Cu^{2+}$ -Ions untersucht. Die biologische Relevanz besteht hierbei in der erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über die Fenton-Reaktion unter einem Überschuss an Kupfer-Ionen [31, 32]. Obwohl eine Monomer-Interaktion mit der Bindung des  $Cu^{2+}$  durch ein einzelnes Carnosin-Molekül diskutiert wird, gilt eine Komplexbildung über zwei Carnosin-Moleküle pro  $Cu^{2+}$  als wahrscheinlicherer Mechanismus [33, 34], auch wenn dessen Existenz *in vivo* fraglich bleibt [35]. Während eine  $Cu^{2+}$ -Komplexbildung durch Carnosin der Prävention oxidativer Schäden durch Verminderung der Reaktivität dienen könnte, folgt die Chelatierung von Zink-Ionen einem anderen Ansatz. Durch Carnosin

komplexiertes Zink stellt eine stabilere Form der Darreichung dar als elementares Zink alleine [36]. Dieses und weitere Effekte durch Carnosin selbst tragen zur Integrität der gastrointestinalen Mukosa bei [37]. Die anti-oxidativen Eigenschaften von Carnosin sind nicht nur auf die Chelatierung von Metall-Ionen beschränkt, sondern ROS können auch direkt inaktiviert werden. Sowohl das *Quenching* von Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ), Hydroxyl-Radikalen ( $HO\cdot$ ) und Singlet-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) wurde bereits beschrieben. Verschiedene ROS werden über unterschiedliche Mechanismen durch Carnosin inaktiviert. Die Reaktivität von Superoxid-Anionen wird vermutlich durch einen Ladungstransfer-Komplex durch Carnosin verringert [38], der ähnlich effektiv ist wie das Antioxidans  $\alpha$ -Tocopherol [39, 40]. Das *Quenching* von Hydroxyl-Radikalen verläuft mit hoher Rate unter Bildung stabiler Intermediate über den Imidazolring des L-Histidins [41]. Auch Singlet-Sauerstoff wird wahrscheinlich über den Imidazolring an Carnosin gebunden, jedoch etwa 2- bis 4-fach schneller als durch L-Histidin allein [42].

In biologischen Systemen können ROS mit Proteinen, Lipididen, Nukleinsäuren oder auch Kohlenhydraten reagieren und diese schädigen [43-45]. So kann etwa bei DNA oxidativer Stress zu Strangbrüchen oder Falschpaarungen der Basen führen [46]. Doch nicht nur Funktionalität und Stabilität der oxidierten Moleküle sind verändert, es entstehen auch Intermediate wie Dialdehyde (Malondialdehyd, Methylglyoxal) oder  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigte Aldehyde (Acrolein, 4-Hydroxynonenal), die ihrerseits sehr reaktiv sind [47]. Aus diesen können durch komplexe mehrstufige Reaktionen schlussendlich *advanced lipoxidation endproducts* (ALEs) und *advanced glycation endproducts* (AGEs) gebildet werden [48, 49]. Pathologisch erhöhte Konzentrationen von ALEs und AGEs treiben in der Folge die Progression von Krankheiten wie Diabetes mellitus, beispielsweise als Aktivatoren inflammatorischer Signalkaskaden [50, 51]. Darüber hinaus können die reaktiven Intermediate selbst erneut Schädigungen verursachen. So induzieren beispielsweise reaktive Metabolite der Lipidoxidation Protein- oder DNA-Schäden [52]. Carnosin und Anserin können diese oxidativen Prozesse und ihre Folgen neben dem direkten ROS-*Quenching* auch durch Inaktivierung der reaktiven Intermediate verhindern und somit die Bildung von AGEs und ALEs reduzieren [53-56].

### 2.3. Synthese von Carnosin und Anserin

Die Carnosinsynthese erfolgt über das Enzym Carnosinsynthase (EC 6.3.2.11, CS), das von dem Gen *ATPGD1* codiert wird [57]. Neben L-Histidin und  $\beta$ -Alanin ist die Synthese abhängig von Adenosintriphosphat (ATP) und  $Mg^{2+}$  [58, 59]. Die Expression wurde im Menschen in Muskel, Gehirn und Niere [14, 57], und in Mäusen in Muskel und Gehirn nachgewiesen [60]. Die Substratspezifität des Enzyms ist nicht auf L-Histidin und  $\beta$ -Alanin beschränkt. Auch Lysin, Ornithin und Arginin können mit verminderter katalytischer Effizienz statt L-Histidin als Substrat der CS dienen [61, 62]. Die daraus resultierenden Dipeptide konnten jedoch in Ratten in keinem der Gewebe mit hoher CS-Expression in größerer Abundanz nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass vielmehr durch das Enzym PM20D2 ein Abbau von  $\beta$ -Alanyl-lysin,  $\beta$ -Alanyl-ornithin,  $\gamma$ -Aminobutyryl-lysin und  $\gamma$ -Aminobutyryl-ornithin, doch nicht von Carnosin und Anserin, stattfindet [61]. PM20D2 übernimmt somit eine *metabolite proofreading*-Funktion für die CS im Carnosinmetabolismus und entfernt falsch synthetisierte Dipeptide.

Die Synthese von Carnosin ist über die Konzentration von  $\beta$ -Alanin limitiert [63]. Das semi-essenzielle, proteinogene L-Histidin ist nicht limitierend [64]. In Menschen und auch Mäusen findet für  $\beta$ -Alanin weder eine *de novo*-Synthese wie in Prokaryoten [65], noch eine Umwandlung aus der  $\alpha$ -Form der Aminosäure, L-Alanin, statt. In Säugern wird  $\beta$ -Alanin hauptsächlich in geringen Konzentrationen aus der Degradation von Uracil in der Leber generiert [66, 67]. Bei exogener Supplementation kann zwar eine Erhöhung der Carnosinkonzentration erreicht werden [68], doch nur 3-6 % des  $\beta$ -Alanins werden zur Carnosinsynthese genutzt [69]. Durch die Enzyme 4-Aminobutyrat-2-oxoglutarat-Transaminase (GABA-T) und Alanin-glyoxylat-Transaminase (AGXT2) findet möglicherweise eine Transaminierung des  $\beta$ -Alanins statt, die eine Nutzung als Carnosinsubstrat ausschließt [70, 71]. Ein Großteil des supplementierten  $\beta$ -Alanins wird dadurch vermutlich dem Energiestoffwechsel über den Citratzyklus zugeführt statt der HDP-Synthese [9].

Anserin kann ebenfalls über die Carnosinsynthase synthetisiert werden. Dabei dient Methyl-L-histidin statt L-Histidin als Substrat [72]. Zusätzlich ist die Synthese über das Enzym Carnosin-N-Methyltransferase (EC 2.1.1.22) möglich, das eine Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin auf Carnosin überträgt [73]. Die Expression des Gens konnte bereits in verschiedenen Organismen gezeigt werden, darunter auch Mensch und Maus



[74, 75], doch ist dieses Enzym wie die gesamte HDP-Synthese wenig charakterisiert [76].

#### **2.4. Abbau von Carnosin und Anserin**

Carnosin wird durch das Enzym Carnosinase 1 (EC 3.4.13.20, CN1), codiert durch das Gen *Cndp1* (*CNDP1* im Menschen), zu  $\beta$ -Alanin und L-Histidin abgebaut [77]. Dieses Enzym besitzt eine hohe Substratspezifität, baut aber neben Carnosin auch Anserin und Homocarnosin ab [78]. Die Abbaurate der acetylierten oder methylierten Carnosinderivate durch CN1 ist geringer als von Carnosin selbst [79]. CN1 gehört zur Familie der M20-Metallopeptidasen mit einem katalytischen Zentrum mit zwei  $Zn^{2+}$ -Ionen und kann als Monomer oder Dimer *in vivo* vorliegen [80]. Beim Menschen wurde *CNDP1*-Expression vor allem in Gehirn, Leber [78] und der Niere [14] nachgewiesen, während in Mäusen und Ratten das *Cndp1*-Gen nur in der Niere, jedoch nicht im Gehirn exprimiert wird [81]. Im Menschen erfolgt zusätzlich die Sekretion der CN1 von der Leber ins Blut, was zur ursprünglichen Bezeichnung des Enzyms als *human serum carnosinase* führte [82]. Im Gegensatz zu Nagern ohne Serum-CN1 erschwert dies die orale Supplementation von Carnosin beim Menschen, da über den Verdauungstrakt aufgenommenes Carnosin im Blut wieder abgebaut wird [13]. Eine temporäre Erhöhung im Blut, etwa nach Verzehr von Fleisch, ist dennoch nachweisbar [22]. Die Sekretion der CN1 ins Blut wird durch ein Signalpeptid aus 4 bis 8 Leucin-Wiederholungen [83, 84] sowie die N-Glykosylierung des Proteins reguliert [85]. Beim Menschen existieren mehrere Polymorphismen des *CNDP1*-Gens, welche die Länge des Signalpeptids bestimmen [86]; ab 5 oder weniger Leucin-Wiederholungen ist die Sekretion der CN1 reduziert [84].

Die CN1-Aktivität ist bei Kindern niedriger als bei Erwachsenen, möglicherweise durch unterschiedliche Enzymkonformationen [87]. Des Weiteren besitzen Frauen eine höhere CN1-Aktivität als Männer [88]. Die Aktivität der CN1 kann durch mehrere Mechanismen reguliert werden. Aufgrund der Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen, konnte gezeigt werden, dass durch geringe Cadmiumkonzentrationen die Aktivität durch Verdrängung eines  $Zn^{2+}$ -Ions inhibiert werden kann. Bei höheren Konzentrationen, wenn beide möglichen Positionen mit Cadmium-Ionen besetzt sind, steigt die Aktivität wieder an [78]. Eine Inhibierung ist zusätzlich durch Cysteinylierung

durch Cystein oder cysteinhaltige Moleküle wie Glutathion möglich, die zu einer Konformationsänderung der CN1 führen, welche eine weniger effektive Substratbindung ermöglicht [89]. Ein ähnlicher aktivitätsmindernder Effekt wurde durch Nitrosylierung durch Stickstoffmonoxid beobachtet, wobei potenziell die gleichen Aminosäure-Seitenketten nahe des katalytischen Zentrums des Enzyms als Reaktionspartner dienen wie bei der Cysteinylierung. Im Gegenzug führt eine Carbonylierung durch reaktive Metabolite wie Methylglyoxal zur Erhöhung der CN1-Aktivität [90].

## **2.5. Carnosin und diabetische Nephropathie**

### **2.5.1. Diabetische Nephropathie**

Diabetes mellitus besitzt eine Prävalenz von 8,8 % der Weltbevölkerung in 2017 (425 Millionen) und bis zum Jahr 2045 werden weltweit 629 Millionen Erkrankte prognostiziert [91]. Zu den zahlreichen diabetischen Spätkomplikationen gehört neben der diabetischen Angio-, Neuro- und Retinopathie die diabetische Nephropathie (DN), auch als *diabetic kidney disease* (DKD) bezeichnet [92]. Diese tritt bei 20 – 40 % aller Patienten mit Diabetes mellitus auf und ist die Hauptursache für *end stage renal disease* (ESRD), die schlussendlich durch auf eine auf unter 15 % oder weniger verminderte Nierenfunktion eine Dialyse oder Nierentransplantation bedingt, und ohne diese Maßnahmen letal ist [93, 94]. Sie ist definiert über eine pathologische Konzentrationserhöhung von Albumin im Urin, eine entsprechende Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und glomeruläre Läsionen [95]. Histologisch wird die DN in vier Klassen unterteilt. Klasse I zeichnet sich durch eine Verdickung der glomerulären Membran und keine/geringe Veränderungen des Gewebes unter dem Mikroskop aus. Bei Klasse II kommt es zur mesangialen Expansion ohne noduläre Sklerose. Klasse III ist definiert über das Auftreten nodulärer Sklerose (Kimmelstiel-Wilsons-Läsionen) und in Klasse IV sind mehr als 50 % der Glomeruli durch Glomerulosklerose vernarbt [96]. Funktionell kann eine Einteilung der DN-Progression anhand der GFR erfolgen [97]. Initial kommt es zur Hyperfiltration mit gesteigerter GFR, möglicherweise aufgrund von glomerulärer Hypertrophie [98] oder verändertem Gefäß-Tonus der prä- und postglomerulären Arteriolen [99]. Hierauf folgt eine Phase

vermeintlicher Normalisierung der GFR bevor der kontinuierliche GFR-Abfall einsetzt [100].

Zur Entstehung und Progression der DN tragen verschiedene Mechanismen bei. Diese sind außer durch die dem Diabetes mellitus zugrundeliegende Hyperglykämie auf eine Dyslipidämie und einen erhöhten oxidativem Stress zurückzuführen [101]. Diese pathologischen Veränderungen führen unter anderem zur vermehrten Bildung von AGEs [102]. AGEs modifizieren ihrerseits Proteine und beeinträchtigen so deren Struktur und Funktion. In der Niere führt das *Crosslinking* der Proteine durch AGEs sowohl zur Verdickung der Basalmembranen als auch zur Akkumulation der extrazellulären Matrix des Mesangiums [103]. Neben diesen extrazellulären Auswirkungen üben AGEs auch Rezeptor vermittelt, z.B. über den AGE-Rezeptor RAGE, intrazellulären Effekte im renalen Gewebe aus [104].

Durch verschiedene Signalkaskaden wie den *mitogen-activated protein kinase*-Signalweg (MAPK) und die Translokation von NF- $\kappa$ B kommt es vor allem zu expressionsalternierenden Effekten [105]. Eine Folge ist die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine, die zur mesangialen Hypertrophie führen und neben der Akkumulation der extrazellulären Matrix damit zur Expansion des Mesangiums beitragen [101]. Sowohl durch RAGE-gekoppelte Signalkaskaden [106] als auch den Glukoseüberschuss [107] entstehen wieder neue ROS und AGEs, sodass auch innerhalb der Zellen des Glomerulus vermehrt die Modifikation von Proteinen, Lipididen und Nukleinsäuren durch diese stattfindet.

Neben den Mesangiumzellen ist auch die glomeruläre Filtrationsbarriere bestehend aus Endothelzellen, der endothelialen Basalmembran und den Podozyten bei DN verändert. Für das Endothel ist vor allem die reduzierte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) von hoher Bedeutung, da hierdurch der Tonus insbesondere der vorgeschalteten Arteriolen, die Proliferation der glomerulären Endothelzellen selbst und die Permeabilität der glomerulären Kapillaren reguliert werden [108, 109]. Die lokale NO-Konzentration ist zum einen in Folge der Neutralisation durch ROS und AGEs [110], aber auch durch posttranslationale Modifikationen der endothelialen NO-Synthase (eNOS) bei Diabetes mellitus vermindert [111]. Zusätzlich ist vermutlich die Filtration durch

einen partiellen Verlust der Glykokalyx der Endothelzellen in Folge der ROS-Exposition und Hyperglykämie gestört [112].

Podozyten bilden die andere Seite der Filtrationsbarriere und tragen mit ihren Fußfortsätzen zur größenabhängigen Selektivität dieser Barriere bei. Bei der DN kommt es zu einem Podozytenverlust durch eine Reihe unterschiedlicher Signalwege wie RAGE, MAPK oder TGF $\beta$ , die entweder ein Ablösen oder eine Apoptose der Zellen bedingen [113-115]. Außer einem totalen Verlust der Podozyten wurde auch eine Veränderung des Filtrations-Diaphragmas durch Umformung und Abflachung der Fußfortsätze gezeigt [101], wahrscheinlich als Resultat einer Kombination aus veränderten Diaphragma assoziierten Proteinen, abnormer Zytoskelettausbildung und Veränderungen des Membranpotenzials der Zellen [116]. Daraus resultiert zusammen mit dem Zellverlust eine verringerte Selektivität der glomerulären Filtrationsbarriere und damit eine Proteinurie.

Während der Verlust von Podozyten und die mesangiale Expansion frühe Anzeichen der DN sind, unterlaufen die Tubuli der Niere parallel dazu eine Phase der Hyperplasie mit einem Wechsel zur Hypertrophie [117]. Die Hyperplasie wird durch die erhöhte Aktivität und Expression verschiedener Wachstumsfaktoren angetrieben [118], die wiederum eine Ornithindecaboxylase-Überexpression (ODC), welche einen limitierenden Schritt im Zellzyklus zwischen in Hyperplasie und Hypertrophie kontrolliert [119], aktivieren. Der Wechsel zur Hypertrophie erfolgt durch TGF $\beta$  [120, 121], das nicht nur in den Tubuli, sondern allgemein substantiell zum Wachstum der Niere bei Diabetes mellitus beiträgt [122]. Auch die für die Progression der DN zur ESRD bedeutende Fibrosierung der Tubuli [123], kann neben anderen Faktoren wie der mesenchymalen Transition von Tubulusepithelzellen [124] mit einer Induktion durch TGF $\beta$  in Verbindung gebracht werden [125].

### **2.5.2.     Therapeutisches Potenzial von Carnosin**

Die Prävention und Behandlung der DN ist generell auf bekannte Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hyperglykämie, Dyslipidämie, eine lang andauernde diabetische Stoffwechsellage und Übergewicht fokussiert [126, 127]. Die konventionelle Therapie besteht zumeist aus dem Einsatz von *angiotensin converting enzyme*-Inhibitoren (ACE-Hemmern), Angiotensin II-Rezeptor-Blockern (ARB) [128, 129], intensiver

Blutzuckerkontrolle [130] und *lifestyle*-Interventionen wie moderater Ausdauersport oder eine Ernährungsumstellung [131]. Hierüber kann zwar teilweise eine effektive Verbesserung des Zustands von Patienten mit DN erreicht werden, doch ob z.B. eine strikte glykämische Kontrolle tatsächlich einen Funktionsverlust der Niere verhindern kann, ist immer noch Gegenstand von Diskussionen [132, 133]. Auch die große Bedeutung von reaktiven Metaboliten für die Entstehung und Progression der DN ist eine vergleichsweise neue Erkenntnis und fließt kaum in die Behandlung mit ein. Hieraus entsteht ein großes Potenzial von Carnosin für die Therapie der DN.

Ein Großteil der Erforschung der therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten von Carnosin bei Diabetes mellitus wurde in Nagern durchgeführt. Durch das Fehlen einer Serum-CN1 gestaltet sich die orale Supplementation hier im Kontrast zum Menschen vergleichsweise einfach und führt zu erhöhten Serum- und Gewebekonzentrationen von Carnosin. In diabetischen Ratten führte eine 12-wöchige orale Carnosinsupplementation zu 100-fach erhöhten renalen Carnosinspiegeln [134] und eine 24-wöchige Supplementation zu 14-fach erhöhten renalen Konzentrationen in *Zucker obese rats* [135]. Sowohl in der Wahl des Diabetesmodells als auch bei der Dauer und Dosis der Carnosinsupplementation gibt es eine große Variabilität in diesen Tiermodellen. So wurden beispielsweise sowohl Streptozotocin (STZ) induzierte Typ I-Diabetes-Modelle [136] als auch Typ II-Diabetes-Modelle wie BTBR ob/ob-Mäuse genutzt [137]. Auch der beobachtete Einfluss von Carnosin auf diabetischen Komplikationen variiert in verschiedenen Studien, was unter anderem durch das Fehlen einheitlicher Untersuchungskriterien begründet ist. Konsistent war dennoch oftmals eine Reduktion von Albuminurie bzw. Proteinurie bei Carnosinsupplementation in Typ I- [138, 139] und auch Typ II- [90, 140] Diabetes-Modellen. Darüber hinaus konnte auch eine Verbesserung der Morphologie durch Carnosin festgestellt werden. Sowohl in db/db-Mäusen [140] als auch in Zellkulturexperimenten mit Mesangialzellen von Ratten unter hyperglykämischen Bedingungen [141] konnte eine Verringerung der mesangialen Expansion bzw. Proliferation gemessen werden. Carnosin verhinderte den Verlust von Podozyten in STZ behandelten Ratten [134, 139] und BTBR ob/ob-Mäusen [137]. Auch die glomeruläre Fibrosierung [142], Verdickung der Basalmembran und Glykogendeposition in den Tubuli [138] konnte durch den Einfluss von Carnosin

vermindert werden. Die Reduktion der glomerulären Hypertrophie legt darüber hinaus eine Minimierung der renalen Hyperfiltration durch Carnosin nahe [143].

Die positiven Auswirkungen von Carnosin in Nagern auf die Vielzahl der pathologischen Veränderungen der Niere bei der DN konnten auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Hierzu gehört der Einfluss auf die Glukosehomöostase. In den diabetischen Tiermodellen konnte der Blutzuckerspiegel [136, 144] bzw. der Anteil des glykierten Hämoglobins (HbA<sub>1c</sub>) [137] durch Carnosinsupplementation normalisiert werden. Zusätzlich wurde eine erhöhte Expression des Insulingens [19] sowie ein Anstieg der  $\beta$ -Zellen-Masse [20] mit gesteigerter Insulinmenge [136, 145, 146] in diabetischen Tiermodellen durch Carnosingabe beobachtet. Auch eine Reduktion der bei Diabetes mellitus erhöhten ROS- sowie AGE-Konzentrationen konnte durch Carnosinsupplementation detektiert werden. Die Konzentration von AGEs war in diabetischen nephrektomierten Ratten [139] und nicht-diabetischen ApoE-Knockout-Mäusen [142] unter Carnosingabe verringert. In STZ behandelten Ratten reduzierte Carnosin sowohl das reaktive Intermediat Malondialdehyd (MDA) als auch AGEs [147]. Carboxymethyllysin (CML), das einen prominenten Vertreter der AGEs darstellt [148], wurde in db/db-Mäusen durch Carnosininjektion in verminderter Konzentration detektiert [140]. Auch das *Quenching* von Acrolein [137] sowie verringerte Lipoxidation [136] gehören zu den beobachteten Effekten von Carnosin in diabetischen Tieren. Ebenfalls beschrieben ist der Einfluss auf zytoprotektive und antioxidative Systeme durch Carnosin. Hierzu gehört eine erhöhte Glutathionkonzentration [149] sowie eine gesteigerte Katalase- [136] und Superoxiddismutase-Aktivität [150, 151].

Diese Studien betrachten natürlich stets nur einige der genannten Parameter und zeigen auch zum Teil widersprüchliche Resultate. Des Weiteren sind Effekte nicht immer nur auf eine Ursache zurückzuführen und vollständig voneinander trennbar. Beispielsweise kann Carnosin vermutlich ROS direkt inaktivieren [41, 42] und damit deren Konzentration reduzieren. Durch die Verknüpfung von Hyperglykämie mit erhöhten ROS-Konzentrationen [152] kann aber eine Normalisierung des Blutglukosespiegels wahrscheinlich ebenso die ROS-Produktion verringern. Hierdurch bleibt nicht nur unklar wie groß der Beitrag einzelner potenziell protektiver Effekte von Carnosin bei Diabetes mellitus auf die DN ist, sondern auch die Frage der Relevanz lokaler Mechanismen in der

Niere gegenüber einer systemischen Wirkung auf die Glukosehomöostase, die sekundär auch das Nierengewebe beeinflussen kann.

Naturgemäß sind humane Studien im Vergleich zu den Experimenten mit Tiermodellen limitierter und die hohe Serum-Aktivität der CN1 beim Menschen im Vergleich zum Nager erschwert Therapieansätze bei Diabetes mellitus mittels Carnosin-Supplementation. Da die CN1-Aktivität durch Carbonylierung des Enzyms erhöht wird, ist zusätzlich der Carnosinabbau beim Diabetes mellitus durch die erhöhten Konzentrationen reaktiver Metabolite gesteigert [90]. Die Sekretion der CN1 von der Leber ins Blut ist abhängig von einem Signalpeptid aus 4 bis 8 Leucin-Wiederholungen und ab 5 oder weniger Wiederholungen reduziert [84]. Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit Typ II Diabetes mellitus und einem Polymorphismus, der die Anzahl der Leucin-Wiederholungen auf 5 reduziert (CTG<sub>5</sub>), dem sogenannten Mannheim-Allel, ein geringeres Risiko für die DN aufweisen [86, 153]. Diese Assoziation konnte in Gewebebiopsien von Patienten mit Diabetes mellitus bestätigt werden [154]. Auch in anderen Ethnien wie Kaukasiern [155], Japanern [156], Süd-Asiaten [157] und Nord-Indern [158] konnte eine Verbindung zwischen dem Mannheim-Allel und der DN gezeigt werden. Der protektive Effekt des Polymorphismus ist vermutlich nicht auf die DN beschränkt und konnte auch bei Kindern mit einer langsam progredienteren Glomerulonephritis, nicht aber mit anderen Glomerulopathien assoziiert werden [159, 160]. Aus der Beobachtung dieser positiven Effekte bei reduzierter Serum-Aktivität resultierten ebenfalls Therapieansätze mit CN1-Inhibitoren wie Carnostatine, das effektiv die Aktivität der CN1 minimiert und die Konzentration von Carnosin in der Zirkulation erhöht [161].

Trotz des zusätzlichen Hindernisses der Serum-Aktivität der CN1 beim Menschen existieren Studien zum therapeutischen Einsatz bei Diabetes mellitus und DN, die ähnliche Effekte wie in den Tiermodellen zeigen konnten. In Individuen mit gestörter Glukosetoleranz konnte eine mehrwöchige Carnosingabe den Nüchterninsulinspiegel erhöhen und den Blutzuckerspiegel im Vergleich zu Kontrollen im Glukosetoleranztest signifikant reduzieren [162]. In prä-diabetischen Probanden [163] und Typ II-Diabetes-Patienten [164] führte Carnosinsupplementation zur Erniedrigung des Blutzuckerspiegels. In Patienten mit DN verringerte eine Carnosinbehandlung die Konzentration von Markern oxidativen Stresses wie Malondialdehyd und AGEs,

reduzierte die HbA<sub>1c</sub>-Konzentration und verbesserte die Proteinurie [164, 165]. Aus der Kombination der Hemmung der CN1 im Serum über Inhibitoren wie Carnostatine und paralleler Supplementation mit Carnosin ergibt sich somit auch beim Menschen ein therapeutisches Potenzial für Patienten mit Diabetes mellitus und insbesondere einer DN.

## **2.6. Zielsetzung**

Das Dipeptid Carnosin und sein Derivat Anserin zeigten in vielen Studien einen positiven Einfluss auf den Verlauf einer Diabetes mellitus-Erkrankung und die Entstehung sowie Progression damit assoziierter Komplikationen bzw. Spätschäden wie der diabetischen Nephropathie. In den Nieren von Mäusen sowie des Menschen erfolgt der Abbau von Carnosin durch das Enzym Carnosinase 1 (CN1), die Synthese von Carnosin durch die Carnosinsynthase (CS). Die protektive Wirkung von Carnosin wurde bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt. *In vitro* konnte Carnosin reaktive Metabolite wie Produkte der Lipid- und Proteinoxidation inaktivieren, eine Wirkung als Antioxidans wird diskutiert. In *in vivo*-Modellen der diabetischen Nephropathie führte die Supplementation von Carnosin zu einer deutlichen Verbesserung der Glukosehomöostase und verringerte die Albuminurie, mesangiale Expansion und glomeruläre Fibrosierung. Beim Menschen korreliert ein niedriger Carnosinabbau mit einem relativen Schutz vor der diabetischen Nephropathie, insbesondere bei Frauen.

Unklar bleibt über welchen Mechanismus diese Protektion, sowohl auf zellulärer Ebene als auch im Tiermodell, erfolgt. Es ist nicht bekannt, ob diese *in vitro* beobachteten Effekte auch lokal in den Nieren wirksam sind oder doch vielmehr ein systemischer Effekt über die Glukosehomöostase hierfür verantwortlich ist.

Um dies aufzuklären wurde in dieser Arbeit:

1. Ein Mausmodell mit einem homozygoten, globalen Knockout des Carnosinase 1-Gens (*Cndp1*) charakterisiert. Da in der Maus die Carnosinase 1 lediglich im Nierengewebe exprimiert wird, stand die Morphologie und Funktionalität der Nieren im Mittelpunkt dieser Studien.



2. Zusätzlich wurden mögliche Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress und chronische Entzündungsprozesse im Nierengewebe auf Gen- und Proteinebene untersucht.
3. Ebenso sollte überprüft werden, ob von erhöhten renalen Carnosinkonzentrationen systemische Effekte auf Glukosehomöostase sowie Körper- und Organgewichte ausgehen.
4. Ob eine mögliche Wechselwirkung zwischen Carnosin und Methylglyoxal, einem reaktiven Aldehyd, dessen Konzentration bei Patienten mit Diabetes mellitus erhöht ist, vor diabetischen Spät komplikationen schützen kann, war ebenfalls Gegenstand dieser Untersuchungen. Vor der Übertragung in das *Cndp1*-Knockout-Mausmodell, sollte dies zuerst mechanistisch in zellfreier Umgebung und nachfolgend im Zellkulturmodell mit humanen Tubulusepithelzellen aufgeklärt werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
2-(Methylthio)ethanol ≥ 99 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
2-Propanol ROTISOLV® ≥ 99,95 %, Ultra LC-MS	Roth, Karlsruhe
5-Sulfosalicylic acid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
6-Aminocaproic acid, ≥ 99 % (titration), powder	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Acetonitril Gradient Grade	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure 98 %	Roth, Karlsruhe
Ammonium persulfate	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bestatin hydrochloride ≥ 98 % (HPLC)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Boric acid BioXtra, ≥ 99.5 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau, Natriumsalz für die Elektrophorese	AppliChem, Darmstadt
BSA, Molecular Biology Grade	New England Biolabs, Ipswich, USA
Carbazole-9-carbonyl Chloride	TCI, Tokyo, Japan
Deuterium oxide 99.9 atom % D, contains 0.05 wt. % 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid, sodium salt	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

D (+)-Glucose, wasserfrei, für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
D-Mannitol ≥ 98 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid zur Analyse EMSURE® ACS	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ≥ 98 %, Ph.Eur., USP	Roth, Karlsruhe
Dodecylsulfate Na-salt in Pellets	Serva, Heidelberg
D(+)-Saccharose ≥ 99,5 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, ≥ 99 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Ethanol ≥ 99,8 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid - Lösung 1 %	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure 100 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
FITC-Sinistrin	Fresenius-Kabi, Bad Homburg
Glycerol for molecular biology, ≥ 99 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
HEPES ≥ 99,5 %, BioScience-Grade	Roth, Karlsruhe
Hydroxylamine hydrochloride ReagentPlus®, 99 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Imidazol ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid ≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO	Roth, Karlsruhe
L-Carnosine	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Methanol, ≥ 99,9 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Milchpulver Blotting-Grade, pulv., fettarm	Roth, Karlsruhe
Monobrombimane	Merck, Darmstadt
N ε-(tert-Butoxycarbonyl)-L-Lysin	TCI Deutschland, Eschborn
NaCl 0,9 % B.Braun, Ecolav®	B. Braun Melsungen, Melsungen
Natriumacetat ≥ 98,5 %, reinst, wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid > 99,8 %, mit Antitackmittel	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe
N-Ethylmaleimide	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phthaldialdehyde for fluorescence, ≥ 99.0 % (HPLC)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Potassium phosphate monobasic	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Rotiphorese® Gel 30 (37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure rauchend 37 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Sodium deoxycholate ≥ 97 % (titration)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TEMED, 99 %, p.a., für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Tetrahydrofuran stabilisiert, EMSURE® ACS, Reag. Ph. Eur. zur Analyse	Merck, Darmstadt
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide powder, BioReagent, suitable for cell culture	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tris	GE Healthcare, Chicago, USA
Triton® X 100	Roth, Karlsruhe

Tween® 20, Ph.Eur.	Roth, Karlsruhe
Wasser für die HPLC	neoLab, Heidelberg

### 3.1.2. Kits und Standards

Bezeichnung	Hersteller
6x DNA loading dye	Thermo Scientific, Waltham, USA
AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit	Waters, Milford, USA
Color Protein Standard, Broad Range	New England Biolabs, Ipswich, USA
Creatinine Colorimetric/Fluorometric Assay Kit	BioVision, Milpitas, USA
DC™ Protein Assay	Bio-Rad, München
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mouse Albumin ELISA	Alpco, Salem, USA
OxiSelect™ Methylglyoxal (MG) Competitive ELISA Kit	Cell Biolabs, San Diego, USA
OxyBLot™ Protein Oxidation Detection Kit	Merck, Darmstadt
Phire Tissue Direct PCR Master Mix	Thermo Scientific, Waltham, USA
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

### 3.1.3. Enzyme und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Clarity Western ECL Substrate	Biorad, Hercules, USA
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
Deoxynucleotide Mix 10 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DNase I recombinant, RNase free	Roche, Basel, Schweiz
Insuman® Rapid 40 I.E./ml Injektionslösung in einer Durchstechflasche	Sanofi-Aventis, Paris, Frankreich
Pierce™ Protein-Free (PBS) Blocking Buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Random Hexamer Primer	Thermo Scientific, Waltham, USA
SuperScript IV Reverse Transcriptase	Thermo Scientific, Waltham, USA
SYBR® Green JumpStart™ Taq Ready Mix	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

### 3.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze

0.25% Trypsin-EDTA (1x)	Thermo Scientific, Waltham, USA
DMEM (1X) Glutamax	Thermo Scientific, Waltham, USA
DPBS	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fetal Bovine Serum	Thermo Scientific, Waltham, USA
Interferon-γ from mouse ≥ 98 % (SDS-PAGE)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Pen Strep Penicillin Streptomycin	Thermo Scientific, Waltham, USA
RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I	Thermo Scientific, Waltham, USA

### 3.1.5. Puffer

---

**DHB Matrix**

---

2,5-Dihydroxybenzoesäure	20 mg/ml
Methanol	60 % (v/v)
Trifluoressigsäure	0,1 % (v/v)

---

---

**Krebs-Ringer-HEPES-Puffer**

---

BSA	0,1 % (w/v)
CaCl <sub>2</sub>	1,25 mmol/l
Glukose	5 mmol/l
KCl	4,7 mmol/l
MgSO <sub>4</sub>	1,25 mmol/l
NaCl	136 mmol/l

pH 7,4

---

---

**Lysepuffer für C/A-Konzentrationen und Carnosinase-Aktivität (Mausorgane)**

---

HEPES	20 mmol/l
Mannitol	210 mmol/l
Saccharose	70 mmol/l

pH 7,2

---

---

**Lysepuffer für C/A-Konzentrationen und Carnosinase-Aktivität (Zellen)**

---

NaF	20 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Tris/HCl pH 8,9	20 mmol/l
Triton X 100	1 % (v/v)

---

---

**PBS-Puffer**

---

NaCl	8,0 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g/l
KCl	0,2 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l

auf pH 7,4 mit HCl

---

---

**PBST-Puffer**

---

NaCl	8,0 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g/l
KCl	0,2 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
Tween20	0,1 % (v/v)

---

auf pH 7,4 mit HCl

<b>RIPA-Puffer</b>	
Natriumdeoxycholat	0,5 % (w/v)
NaCl	150 mmol/l
Tris/ HCl pH 8,0	50 mmol/l
Triton X 100	0,1 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)

<b>SDS-PAGE Ladepuffer (6x)</b>	
Bromphenolblau	0,06 % (w/v)
Glycerol	45 % (v/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	12 % (v/v)
SDS	12 % (w/v)
Tris/HCl pH 6,8	480 mmol/l

<b>SDS-PAGE Laufpuffer</b>	
Glycin	14,4 g/l
SDS	1 g/l
Tris	3,02 g/l

<b>SDS-PAGE Sammelgelpuffer</b>	
SDS	0,4 % (w/v)
Tris/HCl pH 6,8	1,5 mol/l

<b>SDS-PAGE Trenngelpuffer</b>	
SDS	0,4 % (w/v)
Tris/HCl pH 8,8	1,5 mol/l

<b>Western Blot Anodenpuffer</b>	
Methanol	20 % (v/v)
Tris/HCl pH 7,4	75 mmol/l

<b>Western Blot Kathodenpuffer</b>	
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	40 mmol/l
Methanol	20 % (v/v)
Tris/HCl pH 9,0	25 mmol/l

### 3.1.6. Geräte

#### 3.1.6.1. HPLC

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Automatischer Probennehmer	Series 200 Autosampler	PerkinElmer, Waltham, USA
Fluoreszenzdetektor	RF-20A	Shimadzu, Kyoto, Japan

HPLC-Säule	Jupiter® 5 µm C18 300 Å, LC Column 250 x 4.6 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
Pumpen-System	System Gold 126 Solvent Module	Beckman Coulter, Brea, USA

### 3.1.6.2. NMR

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
NMR-Spektrometer	Bruker Avance II	Bruker Daltonik, Billerica, USA

### 3.1.6.3. Nukleinsäurearbeiten

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Elektrophoresekammer	Eigenbau	Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg
Mikrowellenherd	R-233(W)	Sharp, Osaka, Japan
Nanophotometer	Nanodrop Lite	Thermo Scientific, Waltham, USA
Netzteil	E835	Consort, Turnhout, Belgien
Thermocycler	C1000 Touch™ Thermal Cycler	BioRad, Hercules, USA
Thermocycler (qPCR)	CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	BioRad, Hercules, USA
UV-Transilluminator	CN-TFX	Vilber, Eberhardzell

### 3.1.6.4. SDS-PAGE und Western Blot

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Elektrophoresekammer	Y001.1	Roth, Karlsruhe
Netzteil	EV3020	Consort, Turnhout, Belgien
<i>Semy Dry</i> Blotting System	Semi-Dry-Blotter MAXI	Roth, Karlsruhe
Western Blot Dokumentationssystem	Fusion SL4	Peqlab, Erlangen
Wippe	ProBlot™ 25 Economy Rocker	LabNet international, Edison, USA

### 3.1.6.5. UPLC (Aminosäuren)

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
-------------	------------	------------

Gekoppeltes Massenspektrometer	Vion IMS QToF	Waters, Milford, USA
UPLC-Säule	CORTECS UPLC C18 Column, 90 Å, 1.6 µm, 2.1 mm X 100 mm	Waters, Milford, USA
UPLC-System	ACQUITY UPLC I-Class System	Waters, Milford, USA

### 3.1.6.6. UPLC (Thiole)

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Fluoreszenzdetektor	ACQUITY-UPLC-FLR-Detektor	Waters, Milford, USA
UPLC-Säule	ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 Column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm	Waters, Milford, USA
UPLC-System	ACQUITY UPLC H-Class System PLUS	Waters, Milford, USA

### 3.1.6.7. Zellkultur

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Inkubator	CB160 E6	Binder, Tuttlingen
Sicherheitswerkbank	Ultrasafe	Faster, Conaredo, Italien

### 3.1.7. Primer

Zielgen	Forward primer (5' nach 3')	Reverse primer (5' nach 3')
<i>Actnβ</i>	GGCACCACACCTTCTACAATG	GGGGTGTGAAGGTCTCAAAC-
<i>Gcs</i>	GATCCTCCAGTTCCTGCACATC	GGAGATGGTGTATTCTTGTC
<i>Hspa1</i>	GAGATCGACTCTCTGTTCGAGG	GCCCGTTGAAGAAGTCCTG
<i>HSPA1</i>	TTTGAGGGCATCGACTTCTACA	CCAGGACCAGGTCGTGAATC
<i>Nos2</i>	AATCTTGGAGCGAGTTGTGG	AATCTTGGAGCGAGTTGTGG
<i>Nfe2l2</i>	CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA	GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT
<i>SLC15A1</i>	ATGTGGCTTCAATTTACCT	GTTAAGACCATCCTTTACCACC

<i>SLC15A2</i>	CTTCTGGTTCTTATCTTCATCCC	ATACTGTTCCCATCTTCACGA
<i>SLC15A3</i>	CTTCACCTCCACATCCCAAA	GCTGGCAAAGATCTCACTGA
<i>SLC15A4</i>	GAGTCTTCATTTGAGGATTCCA	AGCTGAGTATGCAAATTCCA
<i>SLC6A6</i>	GGATGGATTTCTTCTGCCGA	GAGATGAGATATAACCAACTTCACC
<i>Tgfb</i>	CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT
<i>Tnfa</i>	AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA

### 3.1.8. Zellen der *in vitro*-Versuche

Zelltyp	Spezifizierung	Bezeichnung	Herkunft
Mesangialzellen	immortalisiert, <i>Mus musculus</i>	SV40 MES 13 (ATCC® CRL-1927™)	ATCC, Manassas, USA
Podozyten	konditionell immortalisiert, <i>Mus musculus</i>	SV40 Immortomouse	Charles River, Sulzfeld
Tubulusepithelzellen	immortalisiert, <i>Homo sapiens</i>	HK-2 (ATCC® CRL- 2190™)	ATCC, Manassas, USA

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Versuchstiere

#### 3.2.1.1. Mauslinien

In dieser Arbeit wurden *Cndp1*-Knockoutmäuse (*Cndp1*-KO) der Linie B6;129S5-*Cndp1*<sup>tm1Lex</sup>/Mmucd (#032215; MMRRC UC Davis, Davis, USA) verwendet. Bei diesen Tieren wurde durch homologe Rekombination zielgerichtet eine Mutation in den Exons 8 und 9 des *Cndp1*-Gens erzeugt. Diese Tiere wurden für 10 Generationen mit C57BL/6J Mäusen (Charles River, Sulzfeld,) gekreuzt. Durch Rückkreuzung entstandene Nachkommen, die homozygote Träger des *Cndp1*-Knockouts waren, wurden in den Versuchen eingesetzt. Als Kontrollgruppe der Versuche dienten Individuen gleichen Alters mit zwei Wildtyp-Allelen des *Cndp1*-Gens (WT). Die Tierexperimente dieser Arbeit wurden mit 11 und 55 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Die 11 Wochen alte Tiere sind als vollständig entwickelte Adulti vor dem Einsetzen der Seneszenz und die 55 Wochen alten Mäuse als mittelalte Tiere mit Seneszenzerscheinungen beschrieben [166].



### 3.2.1.2. Maushaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in der Interfakultären Biomedizinische Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg mit einem 12-stündigen Licht-Dunkelheit-Rhythmus bei 23 °C sowie Futter- und Wasserversorgung *ad libitum*. Die Verpaarung der Mäuse fand bei beiden Geschlechtern in einem Altersbereich von 8 bis 40 Wochen statt.

### 3.2.1.3. Genotypisierung der Mäuse

Zur Feststellung des Genotyps der Mäuse wurden Gewebebiopsien von Schwanz und Ohr verwendet. Hierbei wurde mittels Phire Tissue Direct PCR Master Mix ohne DNA-Aufreinigung direkt eine PCR aus Gewebestücken von 0,5 mm Durchmesser durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden nach Protokoll des Kits erstellt und je Probe mit zwei Primerpaaren - eines mit Spezifität für das Wildtyp-Allel und eines mit Spezifität für das Carnosinase 1-Knockout-Allel - eine Amplifikation vorgenommen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Primersequenzen zur Genotypisierung der *Cndp1*-Knockoutmäuse und Wildtypmäuse.

Wildtyp spezifisches Primerpaar		
	Name	Sequenz
5'-Primer	DNA020-17	5'-CGTCTAGTCCCTACCATGTCTC-3'
3'-Primer	DNA020-18	5'-CCGCACCTCCAAATGGCTAGT-3'
<i>Cndp1</i> -Knockout spezifisches Primerpaar		
	Name	Sequenz
5'-Primer	NEO3a	5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'
3'-Primer	DNA020-18	5'-CCGCACCTCCAAATGGCTAGT-3'

Die PCR erfolgt entsprechend des folgenden Schemas:

Tabelle 2: Amplifikationsschema der Genotypisierungs-PCR der *Cndp1*-Knockoutmäuse und Wildtypmäuse.

Wildtyp spezifisches Primerpaar			
	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	300	1
Denaturierung	98	10	40
Annealing	65	5	40
Elongation	72	20	40
Finale Elongation	72	120	1

<i>Cndp1</i> -Knockout spezifisches Primerpaar			
Initiale Denaturierung	98	300	1
Denaturierung	98	10	40
Annealing und Elongation	72	20	40
Finale Elongation	72	120	1

Die Proben wurden nach der Amplifikation durch PCR mit Ladepuffer versetzt und bei 120 V in einem 2%-igen Agarosegel (w/v in TAE-Puffer mit 20 µl 1 % Ethidiumbromid) aufgetrennt. Es folgte die Illumination unter UV-Licht zur Auswertung der Amplifikationsprodukte. Die erwartete Größe des Amplifikats des Wildtyp spezifischen Primerpaars beträgt 283 bp und des *Cndp1*-Knockout spezifischen Primerpaars 373 bp. War nur ein Amplifikat nachzuweisen, wurde das Tier als Wildtypmaus, respektive homozygote *Cndp1*-Knockoutmaus klassifiziert. Konnten beide Amplifikationsprodukte in Proben einer Maus gezeigt werden, so handelte es sich um ein Individuum, das heterozygot für den *Cndp1*-Knockout war.

#### **3.2.1.4. Körper- und Organgewichte**

Das Körpergewicht der Tiere wurde jeweils vor der Tötung mittels Feinwaage bestimmt. Futter und Wasser waren bis zu diesem Zeitpunkt *ad libitum* verfügbar. Die einzelnen Organe wurden sofort nach der Tötung der Mäuse und der Präparation vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff gewogen.

#### **3.2.1.5. Intraperitonealer Insulin- und Glukosetoleranztest**

Vor Beginn der Tests wurden die Tiere für 5 Stunden auf Futterentzug gesetzt und während der Durchführung der Versuche ohne Futter und auch ohne Wasser belassen. Die Mäuse wurden fixiert, der Schwanz desinfiziert und mit einer Kanüle eine Vene punktiert. In einem Tropfen des austretenden Bluts wurde die Glukosekonzentration mit einem Blutzuckermessgerät bestimmt. Dieser Wert repräsentiert den Basalwert. Für den Insulintoleranztest wurde die Insulinstammlösung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung auf 1 U/ml verdünnt und den Tieren 1 U/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Für den Glukosetoleranztest wurde 2 g/kg Körpergewicht einer D-Glukoselösung verwendet (20 % w/v in steriler physiologischer Kochsalzlösung).

Bei beiden Experimenten wurde nach 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 100 und 120 Minuten nach der Applikation die Blutglukosekonzentration der Tiere gemessen. Zwischen den jeweiligen Messpunkten wurden die Mäuse wieder in ihre Käfige transferiert. Nach dem Abschluss des Versuchs wurde die Wunde am Schwanz nochmals mit 70 % Ethanol abgewischt und kontrolliert, dass der Blutfluss gestoppt wurde. Den Tieren wurde wieder Futter und Wasser zur Verfügung gestellt.

#### **3.2.1.6. Albumin- und Creatinin-Konzentration im Urin**

Zur Bewertung der Proteinurie wurde das Verhältnis von Albumin zu Creatinin im Spontanurin der Mäuse bestimmt. Für Albumin wurde nach dem Protokoll des Mouse Albumin ELISA Kits und für Creatinin nach Protokoll des Creatinine Colorimetric/Fluorometric Assay Kit verfahren.

#### **3.2.1.7. Glomeruläre Filtrationsrate**

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Mäuse wurde durch transkutane Fluoreszenzmessung der Clearance (Eliminierung) von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Sinistrin durch die Nieren aus dem Blut ermittelt. Einen Tag vor der Messung wurden die Mäuse anästhesiert (initiale Narkose: 5 % Isofluran und 600 ml Sauerstoff pro Minute; Erhaltungsnarkose: 2,5 % Isofluran und 200 ml Sauerstoff pro Minute) und der seitliche Brust- und Rückenbereich rasiert, sowie danach mit Enthaarungscreme vollständig enthaart. Am folgenden Tag wurden die Mäuse auf gleiche Weise erneut narkotisiert und die Messapparatur bestehend aus einer Licht emittierenden Diode ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ) zur Anregung des FITC und einer Fotodiode zur Fluoreszenzdetektion ( $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) mit doppelseitigem Klebefilm an der tags zuvor enthaarten Stelle angebracht. Die Tiere wurden weitere 2 Minuten in Narkose belassen um den Hintergrundwert zu bestimmen. Es folgte die retro-orbitale Injektion von 60  $\mu\text{l}$  FITC-Sinistrinlösung (50 mg/ml in steriler Kochsalzlösung) und die Beendigung der Narkose. Die Tiere wurden zurück in ihre Käfige überführt. Nach 2 Stunden wurde die Messung abgeschlossen und die Geräte ohne zusätzliche Anästhesie entfernt. Die Messgeräte wurde am Computer mittels MPD-Lab (Mannheim Pharma and Diagnostics, Mannheim) ausgelesen und die GFR über ein Ein-Kompartiment-Modell errechnet.

### **3.2.1.8. Lokalisierung von Carnosin, Anserin, GSH und GSSG in der Niere**

Die Lokalisierung von Carnosin, Anserin, reduziertem Glutathion (GSH) und Glutathion-Disulfid (GSSG) in der Niere wurde in Zusammenarbeit mit Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG, Biberach durchgeführt. Es wurde hierzu schockgefrorenes Nierengewebe von 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäuse und Wildtypkontrollen verwendet und Serienschnitte mit einer Dicke von 14 µm mittels Kryomikrotom erstellt, die auf Indium-Zinnoxid beschichtete Glaträger (ITO) transferiert wurden. Diese ITO-Träger wurden mit einem Flachbettscanner digitalisiert und bis zur Analyse in einem Exsikkator getrocknet. Gewebeschnitte, die im Positive-Ionen-Modus gemessen werden sollten, wurden mit einer DHB-Matrix besprüht. Für Messungen im Negative-Ionen-Modus wurde eine 9-Aminoacridin-Matrix (10 mg/ml in 70 % Ethanol) verwendet. Folgend wurde Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektroskopie (MALDI-MS) zum *Mass Spectrometry Imaging* (MSI) eingesetzt. Die Messung für Anserin und Carnosin wurde im Positive-Ionen-Modus mit einer Erhöhung des Dynamikumfangs durch *Continuous Accumulation of Selected Ions* (CASI) mit multiplen *m/z*-Fenstern mit einer Abweichung von  $\pm 5$  vom theoretischen *m/z*-Verhältnis des Zielmoleküls durchgeführt. Die Analyse für GSH und GSSG erfolgte im Negative-Ionen-Modus im *Full-Scan*-Modus mit einem *m/z*-Umfang von 100 bis 3000. *m/z*-Abbildungen wurden mit flexImaging 5.0 (Bruker Daltonik, Billerica, USA) erstellt. Um Schwankungen der Pixel-zu-Pixel-Intensität zu korrigieren, wurde das Spektrum jedes Bildpunkts gegen die Quadratwurzel der Intensität der Gesamtheit seiner Datenpunkte normalisiert. Die untersuchten Verbindungen (Anserin, Carnosin, GSH, GSSG) wurden auf Grundlage der akkuraten Masse ( $< 0,2$  Da im CASI-Modus und  $< 0,005$  Da im *Full-Scan*-Modus) und durch den Vergleich mit einem Referenzstandard auf demselben ITO-Glaträger außerhalb des Gewebeschnitts annotiert.

### **3.2.1.9. Histologische Färbungen**

Histologische Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit der Gewebebank des Nationalen Centrums für Tumorerkrankungen (NCT), Heidelberg und der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt. In Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material der mit PBS perfundierten Mausorgane (Niere, Leber und Muskel) wurde hierzu mit Hematoxylin und Eosin (HE), und

Säurefuchsin-Orange G (SFOG) angefärbt sowie der *periodic acid–Schiff reaction* (PAS) unterzogen und anschließend mit einem Objektträger-Scanner digitalisiert. Folgend wurden die Schnitte nach pathologischen Kriterien evaluiert. Zusätzlich wurden die Färbungen der Schnitte des Nierengewebes densitometrisch mit QuPath v0.1.2 (public domain) bezüglich der Deposition angefärbten Materials in den Glomeruli ausgewertet.

#### **3.2.1.10. Aminosäure-Konzentrationen**

Die Konzentrationen der kanonischen proteinogenen Aminosäuren Alanin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Prolin, Serin, Tyrosin und Valin im Nierengewebe und  $\beta$ -Alanin in Muskel, Niere und Serum von *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypkontrollen wurden in Zusammenarbeit mit dem Centre for Organismal Studies (COS) der Universität Heidelberg vorgenommen. Jeweils 30 mg Gewebe wurde hierzu mit 300  $\mu$ l 100 mmol/l HCl in einem Ultraschallbad homogenisiert und 2 Mal 10 Minuten bei 16400 g und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Die Bestimmung der proteinogenen Aminosäuren erfolgte nach der Methode von Weger et al. [167]  $\beta$ -Alanin wurde dafür zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff AccQ-Tag nach Protokoll des Herstellers markiert. Die Analyse wurde mit einem *ultra performance liquid chromatography* (UPLC)-System, das an ein Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (*quadrupole time-of-flight*; QToF) gekoppelt war, durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte über eine C18-Säule bei 40 °C. Die mobile Phase bestand aus einem binären Gradienten aus Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure (Lösung B) und Acetonitril mit 0,1 % (v/v) wässriger Ameisensäure (Lösung A) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Initial wurde zur Elution eine Mischung mit 98 % Lösung A eingesetzt, die linear über 6 Minuten auf 35 % reduziert wurde. Die Messung per Massenspektrometer geschah im Positive-Ionen-Modus mit einer kapillaren Spannung von 1000 V und einem beobachteten *m/z*-Verhältnis von 260,1 und wurde über UNIFI 1.9.3 (Waters, Milford, USA) aufgezeichnet und ausgewertet.

#### **3.2.1.11. Thiol-Konzentrationen in der Niere**

Thiol-Konzentrationen wurde im Nierengewebe von 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypkontrollen in Zusammenarbeit mit dem Centre for Organismal Studies (COS) der Universität Heidelberg ermittelt. Jeweils 30 mg

Nierengewebe wurde hierzu mit 300 µl 100 mmol/l HCl in einem Ultraschallbad homogenisiert und 2 Mal 10 Minuten bei 16400 g und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Zur Quantifizierung des Gesamtglutathiongehalts wurden Disulfide mit Dithiothreitol (DTT) reduziert, gefolgt von einer Derivatisierung der Thiole mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobrombiman. Zur Messung von Glutathiondisulfid (GSSG) wurden freie Thiole zuerst mit N-Ethylmaleinimid blockiert, Thiole mit DTT reduziert und mit Monobrombiman derivatisiert. Glutathion (GSH)-Equivalente wurden über die Subtraktion der GSSG-Konzentration vom Gesamtglutathiongehalt errechnet. Im nächsten Schritt wurden die Proben nach Wirtz et al. [168] derivatisiert, über ein UPLC-System aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor analysiert. Es wurde zur Auftrennung eine C18-Säule, die bei 40 °C gehalten wurde, und ein binärer Gradient mit 100 mmol/l Natriumacetat pH 5,3 (Lösung A) und Acetonitril (Lösung B) mit folgenden Einstellungen verwendet: 0 Minuten 2,3 % Lösung B, 0,99 Minuten 2,3 % Lösung B, 1 Minute 70 % Lösung B, 1,45 Minuten Lösung B. Die Flussrate betrug 0,85 ml/min. Die Monobrombiman-Konjugate wurden bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm detektiert. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mittels Empower 3 software suite (Waters, Milford, USA).

### **3.2.1.12. Proteinoxidation in der Niere**

Zur Evaluierung der Einführung von Carbonylgruppen in Proteine durch oxidative Reaktionen per OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit wurde Nierengewebe von *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypkontrollen verwendet und zur Probenaufarbeitung nach Protokoll des Herstellers verfahren. Die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE sowie folgend der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran durch Western Blotting vor der Immunodetektion wurden dabei entsprechend 3.2.3.5 und 3.2.3.6. durchgeführt.

## **3.2.2. Zellkultur**

### **3.2.2.1. Anzucht und Kultivierung der Zellen**

Für die Versuche dieser Arbeit wurden konditionell immortalisierte murine Podozyten, immortalisierte murine Mesangialzellen und immortalisierte humane Tubulusepithelzellen eingesetzt. Alle verwendeten Zellkulturmedien und Lösungen wurden zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Sofern Substanzen nicht bereits steril

erworben wurden, wurden sie vor Benutzung autoklaviert oder mit einem sterilen Spritzenfilter filtriert. Des Weiteren wurden alle Arbeiten in einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Inkubatoren mit 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit mit einem Wechsel des Zellkulturmediums im Abstand von 3 Tagen.

Wenn in den nachfolgenden Beschreibungen der Zellkulturmethoden der Begriff „Kulturmedium“ verwendet wird, so meint dieser ein spezifisches Anzuchtmedium, das sich je nach Zelltyp unterscheidet und in 3.2.2.2 bis 3.2.2.4 aufgeführt wird.

### **3.2.2.2. Mesangialzellen**

Mesangialzellen wurden bei 37 °C in Zellkulturflaschen für adhärente Zellen kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 10 % FCS (fetales Kälberserum; v/v) und 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) verwendet.

### **3.2.2.3. Podozyten**

Konditionell immortalisierte Podozyten wurden bei 33 °C in RPMI-Medium mit 10 % FCS (v/v), 2 % Penicillin/Streptomycin (v/v) und 10 U/μl γ-Interferon bis zur Konfluenz auf Kollagen-I beschichteten Zellkulturflaschen angezogen. Nach dieser Proliferationsphase wurden die Zellen zur Ausdifferenzierung auf 37 °C überführt. Hierzu wurde zuvor das Kulturmedium mit γ-Interferon-Zusatz abpipettiert und verworfen und die Zellen mit DPBS gespült, bevor frisches RPMI-Medium mit 10 % FCS (fetales Kälberserum; v/v), 2 % Penicillin/Streptomycin (v/v), jedoch ohne Interferon, zugegeben wurde. Hierauf folgte eine Differenzierungsphase von 10 bis 14 Tagen bevor die Zellen für die entsprechenden Versuche eingesetzt wurden.

### **3.2.2.4. Tubulusepithelzellen**

Tubulusepithelzellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS (v/v) und 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) bei 37 °C in Zellkulturflaschen für adhärente Zellen angezüchtet.

### **3.2.2.5. Zellernte und Passagieren**

Bei Erreichen von Konfluenz zum Passagieren der Zellen oder zur Ernte am Endpunkt eines Versuchs wurde das Kulturmedium abpipettiert und verworfen und die Zellen in den Kulturflaschen mit DPBS gespült. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,25 %iger Trypsinlösung zum Lösen der Adhärenz und die Inkubation im Inkubator bei 37 °C für 2 Minuten für Mesangial- und Tubulusepithelzellen, beziehungsweise 4 Minuten für Podozyten. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe des doppelten Volumens Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 4 Minuten bei 300 g wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette verworfen. Das Zellsediment wurde nun entweder für Messungen eingesetzt oder zum Passagieren in Kulturmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

### **3.2.2.6. Zellviabilität**

Die Zellviabilität von Mesangial-, Tubulusepithelzellen und Podozyten wurde durch Benjamin Singler (Arbeitsgruppe PD Dr. Peters, Universität Heidelberg) im Rahmen seiner Doktorarbeit erfasst und publiziert [169]. Es wurde hierzu der MTT-Test genutzt, der über 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Rückschluss auf die Zellviabilität erlaubt. Hierbei wird von metabolisch aktiven Zellen das MTT-Reagenz zu wasserunlöslichen Formazankristallen umgesetzt, deren Konzentration photometrisch bestimmt wird.

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit 150 µl 0,5 % Gelatine in DBPS (w/v) pro Vertiefung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend die überschüssige Gelatinelösung durch Invertieren der Platte entfernt. Die Zellen wurden entsprechend 3.2.2.5 von den Zellkulturflaschen gelöst und je 5000 Zellen pro Vertiefung in 200 µl Kulturmedium ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Anzuchtmedium verworfen und die Zellen einmal mit 200 µl DBPS pro Vertiefung gespült. Hierauf folgte die Zugabe der Testsubstanzen in 200 µl Kulturmedium mit 0,1 % (v/v) statt 10 % FCS (v/v). Am letzten Tag des Tests wurden jeweils 50 µl MTT-Lösung (2 mg/ml in DBPS) zu allen Vertiefungen mit den Testsubstanzen und auch den unbehandelten Kontrollen, die ausschließlich in Kulturmedium wuchsen, gegeben. Nach einer 4 stündigen Inkubation bei 37 °C unter



Ausschluss von Licht, wurde das Medium aus den Platten pipettiert und jeweils 200 µl DMSO hinzugefügt. Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde zur Lyse der Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler belassen. Es folgte die Bestimmung der Absorption des Lysats bei 590 nm in einem Photometer.

### **3.2.2.7. Expression der Gene der Carnosintransporter**

Die Analyse der Expression der potenziellen Carnosintransporter (PEPT1, PEPT2, PHT1 und PHT2) erfolgte in Mesangial-, Tubulusepithelzellen und Podozyten, die hierfür im jeweiligen Zellkulturmedium unter Standardbedingungen ohne weitere Zusätze angezogen wurden. Nach dem Ernten der Zellen schloss die Extraktion von RNA, das Umschreiben dieser in cDNA und eine Amplifikation durch PCR mit spezifischen Primerpaaren für die unterschiedlichen für Carnosin postulierten Transporter an. Die Proben wurden nach der PCR in einem 1%igen Agarosegel (w/v in TAE-Puffer) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und Unter UV-Illumination ausgewertet.

### **3.2.2.8. HSPA1-Expression**

Tubulusepithelzellen wurden für 24 Stunden in Kulturmedium mit 1 mmol/l Carnosin oder Anserin und in Kombination 60 µmmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder zusätzlich 25 mmol/l Glukose inkubiert. Hiernach erfolgte die Zellernte (3.2.2.5), RNA-Extraktion und reverse Transkription (3.2.3.7 und 3.2.3.8), bevor über qPCR die Analyse der Expression des Gens des Hitzeschockproteins 70 (*HSPA1*) in den Ansätzen erfolgte (3.2.3.9).

## **3.2.3. Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.3.1. Carnosinase-Aktivität**

50 mg in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Gewebe der Mausorgane wurde in 500 µl Lysepuffer homogenisiert. Die Proben wurden 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und anschließend jeweils 37,5 µl der Carnosinsubstratlösung (1 mg/ml) zu 150 µl des Überstands hinzugegeben. Nach Inkubation bei 30 °C für 0, 10, 20 und 40 Minuten mit 40 µl Probenüberstand-Carnosinsubstratlösung-Gemisch per Zeitpunkt wurde die Reaktion gestoppt und frei gewordenen L-Histidin durch Zugabe von 110 µl o-Phthaldialdehyd (5 mg/ml in 2 mmol/l NaOH), Trichlorsessigsäure und 50 mmol/l Tris-Puffer (pH 7,5) im Verhältnis 1 : 1 : 1 derivatisiert. Es erfolgte Die Messung der

Fluoreszenz in einem Mikroplattenleser bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm. Zusätzlich wurden Ansätze mit der Zugabe von Bestatin (1 mg/ml), einem CN2-Inhibitor, zur Carnosinsubstratlösung gemessen, um zu bewerten, ob in den *Cndp1*-Knockoutmäusen Carnosin abbauende enzymatische Aktivität auf CN2 zurückgeführt werden kann.

### **3.2.3.2. Carnosin- und Anserinkonzentrationen**

Carnosin- und Anserinkonzentrationen wurden fluorometrisch per *high performance liquid chromatography* (HPLC) bestimmt. 50 mg schockgefrorenes Gewebe der Mäuse wurde in 500 µl Lysepuffer homogenisiert und für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. 150 µl des Überstands wurden mit 37,5 µl Sulfosalicylsäure (oder 100 µl Serum mit 25 µl Sulfosalicylsäure) für 30 Minuten auf Eis inkubiert und folgend für 5 Minuten erneut bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1 : 3 mit 0,4 mol/l Boratpuffer (pH 9,5) verdünnt. 180 µl der Lösung wurden mit 180 µl Carbazol-9-Carbonylchloridlösung für 90 Sekunden und anschließend mit 108 µl 150 mmol/l Hydroxylaminhydrochlorid mit 68 mmol/l Natriumhydroxid und 2 % Methanol (v/v) für 3 Minuten inkubiert, bevor die Reaktion mit 252 µl Acetonitril in Essigsäure im Verhältnis 8 : 2 (v/v) abgestoppt wurde. Die Proben wurden mit einem automatischen Probennehmer auf eine C18-Säule appliziert und mit einer mobilen Phase aus 82 % HPLC-Lösung A und 18 % HPLC-Lösung B eluiert. Die Detektion der Histidindi-peptide erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 283 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm. Alle Proben wurden hierbei zweimal gemessen, jeweils mit Zugabe von Carnosin und Anserin (0,6 µg/ml), um über die Retentionszeit des zugegebenen Standards eine definitive Identifizierung dieser Moleküle in den Proben zu ermöglichen, und einmal ohne, um über die Fläche der gemessenen Absorption diese Histidindi-peptide in den Proben zu quantifizieren.

### **3.2.3.3. Proteinextraktion**

Zur Proteinextraktion aus Geweben wurden etwa 30 mg des entsprechenden Organs mit einem Messerhomogenisator in 1 ml RIPA-Puffer homogenisiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Zentrifugation bei 4 °C und 10000 g für 25 Minuten. Das

Sediment wurde verworfen und der Überstand nach Bestimmung der Proteinkonzentration für die Experimente verwendet.

#### 3.2.3.4. Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte kolorimetrisch nach der Methode nach Lowry [170] mittels DC™ Protein Assay. Hierzu wurde eine BSA-Eichgerade mit Konzentrationen zwischen 0 mg/ml und 2 mg/ml im identischen Puffer wie die zu messenden Proben erstellt. Anhand dieser Eichgeraden konnte mit der im Photospektrometer bestimmten Absorption der Proben bei 750 nm die Proteinkonzentration errechnet werden.

#### 3.2.3.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) nach Laemmli [171] durchgeführt. Die aufbereiteten Proteinproben (3.2.3.3) wurden auf gleiche Proteinkonzentrationen verdünnt, mit SDS-PAGE-Ladepuffer zur Maskierung der Eigenladung der Proteine versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden jeweils ein Probenvolumen von 20 µl (respektive eine maximale Proteinmenge von 30 µg) sowie ein Proteingrößenmarker auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und für 15 Minuten bei 100 V, gefolgt von 150 V für 55 Minuten, aufgetrennt.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels mit 8 % Acrylamidkonzentration (v/v) im Trenngel.

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	1605 µl	338 µl
Ammoniumpersulfat	60 µl	30 µl
Sammelgelpuffer	-	338 µl
TEMED	6 µl	3 µl
Trenngelpuffer	1500 µl	-
H <sub>2</sub> O	2835 µl	1500 µl

### **3.2.3.6. Western Blot**

Zur Visualisierung und vergleichenden Quantifizierung spezifischer Proteine wurde Western Blotting genutzt. Hierbei mussten die über SDS-PAGE nach Molekülmasse aufgetrennten Proteine zuerst von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Hierzu wurde das *Semi Dry*-Verfahren eingesetzt. Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese zuerst 15 Minuten in Kathodenpuffer bei Raumtemperatur gewaschen und dann in die Western Blot-Kammer gelegt. Auf der Anodenseite wurden drei Lagen Filterpapier, die in Anodenpuffer getränkt wurden, platziert und hierauf die in Kathodenpuffer inkubierte Nitrozellulosemembran, gefolgt von dem Polyacrylamidgel. Auf der Kathodenseite wurden drei weitere Filterpapiere, die in dem entsprechenden Kathodenpuffer eingeweicht wurden, geschichtet. Der Transfer erfolgte nun bei konstanter Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche für 55 Minuten. Die Membran wurde drei Mal 5 Minuten mit PBST gewaschen und anschließend mit Blockierungspuffer zur unspezifischen Absättigung der Proteine für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem primären, gegen das gesuchte Protein gerichteten, Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für je 15 Minuten, wurde erneut eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären, HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppeltem Antikörper inkubiert. Die Membran wurde weitere 3 Mal mit PBST für je 20 Minuten gewaschen, bevor sie für 5 Minuten in ECL-Entwicklungsreagenz, das das Substrat für die Meerrettichperoxidase liefert, geschwenkt wurde. Die Chemilumineszenz wurde mit einem Fluoreszenz/Chemilumineszenz-Imaging-System detektiert und mit ImageJ v1.15d (public domain) densitometrisch quantifiziert. Neben dem Zielprotein wurde jeweils auch ein  $\beta$ -Aktin-Antikörper eingesetzt, auf dessen Chemilumineszenz-Intensität das Signal des anderen primären Antikörpers normalisiert wurde.

### **3.2.3.7. RNA-Aufreinigung**

Der Aufschluss von jeweils 30 mg Material pro Probe der unterschiedlichen Mausorgane oder den geernteten Zellen einer Zellkulturschale nach Ende des entsprechenden Inkubationszeitraums erfolgte mit einem Messerhomogenisator in RLT-Puffer des RNeasy Minikits. Die anschließende RNA-Extraktion aus dem Homogenat wurde nach

Protokoll des Herstellers für Gewebe durchgeführt. Nach der Elution der Nucleinsäuren von den zugehörigen Nucleinsäuren bindenden Säulen des Kits in 45 µl H<sub>2</sub>O, wurde ein DNase I-Verdau zur Degradation genomischer DNA vorgenommen. Zu den einzelnen Proben wurde je 5 µl 10-fach Reaktionspuffer und 1,5 µl DNase-I gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 3 mol/l Natriumacetatlösung (pH 5,2) abgestoppt. Durch weitere Zugabe von 120 µl 100 % Ethanol wurde die RNA über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 16000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 70 µl 70 % Ethanol rückgelöst und erneut bei 16000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der RNA-Rückstand 15 Minuten an der Luft getrocknet, bevor er in 30 µl RNase freiem Wasser resuspendiert wurde. Abschließend wurde die RNA-Konzentration mit einem Spektrophotometer bei einer Absorptionswellenlänge von 260 nm bestimmt.

### 3.2.3.8. Reverse Transkription in cDNA

Mittels reverser Transkription wurde ausgehend von der aus den Mausorganen und Zellkulturansätzen extrahierten RNA komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) zur Verwendung in der qPCR synthetisiert. Es wurde hierbei nach Protokoll der SuperScript IV Reverse Transcriptase mit folgendem Schema für die Reaktionsansätze vorgegangen:

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die reverse Transkription.

dNTP	1 µl
Random hexamer Primer	0,5 µl
RNA	2 µg
H <sub>2</sub> O	ad 15,5 µl

Es folgte die Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C und die anschließende Zugabe von 4 µl 5-fach Reaktionspuffer und 0,5 µl reverse Transkriptase. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur und dann 15 Minuten bei 55 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10-minütige Inaktivierung bei 80 °C beendet und die Ansätze auf Eis abgekühlt.

### 3.2.3.9. Expressionsanalyse mit quantitativer Polymerasekettenreaktion

Zur semiquantitativen Analyse der Expression der Zielgene wurde quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) genutzt. Diese Methode erlaubt anhand detektierter Fluoreszenz, die mit der zunehmenden Menge des Amplifikats in den Reaktionsansätzen korreliert, einen Rückschluss auf die relative Expression eines spezifischen Gens in einer Probe im Vergleich zu einer Kontrolle. Es wurde hierzu die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet, bei der auf eine interne Kontrolle ( $\beta$ -Aktin), deren Expression durch die Zielbedingungen unbeeinflusst ist, normalisiert wird. Für die Berechnung gilt:

$$\Delta C_{t\text{behandelt}} = C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Kontrollgen}}$$

$$\Delta C_{t\text{unbehandelt}} = C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Kontrollgen}}$$

$$\Delta\Delta C_{t\text{behandelt}} = \Delta C_{t\text{behandelt}} - \Delta C_{t\text{unbehandelt}}$$

„behandelt“ entspricht im Falle des Mausmodells dem *Cndp1*-Knockout und „unbehandelt“ bezeichnet den Wildtypkontrollen.

Für die Durchführung wurden entsprechend dem nachfolgenden Schema Reaktionsansätze erstellt:

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die quantitative PCR.

Sybr Green Mix	5 $\mu$ l
cDNA-Lösung (1 : 20 Verdünnung)	1 $\mu$ l
<i>Forward</i> Primer	0,5 $\mu$ l
<i>Reverse</i> Primer	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ l

### 3.2.3.10. Abfangen von Methylglyoxal

Zur Evaluierung der Fähigkeit von Carnosin und Anserin *in vitro* Methylglyoxal zu binden, wurden Carnosin oder Anserin und Methylglyoxal in molarer Ratio von 1 : 1 mit einer finalen Konzentration von 10 mmol/l in 100 mmol/l Natriumphosphatpuffer bei pH 7,4 inkubiert. Als Kontrolle wurde nach gleichem Schema N<sup>ε</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin, das mit Methylglyoxal zum AGE N<sup>ε</sup>-(Carboxyethyl)-lysin (CEL) reagiert, eingesetzt. In Intervallen von 5 Minuten wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 336 nm photometrisch bestimmt. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit einer Bindungsreaktion vom pH-Wert durch die Wiederholung der Inkubationen bei einem pH-Wert von 5,4 und 9,4 untersucht.

### 3.2.3.11. Proteinmodifikationen durch Methylglyoxal

Die Messung der Proteinmodifikationen durch Methylglyoxal erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Nawroth des Universitätsklinikums Heidelberg. Als Test auf Inhibition von Methylglyoxal induzierten Proteinmodifikationen und eine mögliche Verminderung durch Carnosin und Anserin, wurde humanes Albumin aus dem Serum (1 mg/ml in Natriumphosphatpuffer) im molaren Verhältnis 1 : 10 mit Methylglyoxal (54 µg/ml in Natriumphosphatpuffer) bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. In weiteren Ansätzen wurden Carnosin oder Anserin in molaren Verhältnissen von 1 : 1; 2 : 1; 10 : 1; 20 : 1; 100 : 1; 200 : 1; 1000 : 1 zu Methylglyoxal zu der Methylglyoxal-humanes-Albumin-Mischung gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze mit einem 10 kDa-*cut-off*-Filter zur Aufkonzentrierung der modifizierten Proteine zentrifugiert und 3 Mal mit 50 mmol/l Ammoniumcarbonatpuffer gewaschen. Die Proteinlösung wurde in ein Glasgefäß transferiert und in einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Die Proteinproben wurden folgend sowohl zur Analyse per SDS-PAGE und Western Blot mit einem Antikörper gegen CEL, als auch mit einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zur Analyse von Methylglyoxal abgeleiteten AGEs, der nach Protokoll des Herstellers durchgeführt wurde, eingesetzt. Zusätzlich zu den Experimenten in zellfreier Umgebung wurden Tubulusepithelzellen für 6 Stunden mit 0,25 mmol/l, 0,4 mmol/l Methylglyoxal und jeweils in Kombination mit 0,5 mmol/l Carnosin inkubiert. Nach der Ernte der Zellen (3.2.2.5) und der Proteinextraktion (3.2.3.3) wurde mittels Western Blot (3.2.3.6) und einem spezifischem Antikörper die Bildung des Methylglyoxaladdukts Hydroimidazolone (MG-H1) evaluiert.

### 3.2.3.12. Kernspinresonanz-Spektren

Die Interaktionen zwischen Carnosin und Anserin mit Methylglyoxal und damit eine mögliche *Quenching*-Reaktion wurden über Kernspinresonanz-Spektren (*nuclear magnetic resonance*, NMR) in Zusammenarbeit mit Dr. Klika, Universität Heidelberg untersucht. Pulsbreiten wurden nach dem Protokoll von Klika et al. kalibriert [172]. Die chemischen Verschiebungen ( $\delta_s$ ) wurden relativ zum internen Standard 3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3-d<sub>4</sub>-säure-Natriumsalz, für welchen  $\delta_H = 0$  ppm und  $\delta_C = 0$  ppm gilt, bestimmt. Der generelle experimentelle Ablauf inklusive 1D-*nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy* (NOESY)-Pulssequenz mit

Präsaturierung für Wassersuppression, selektivem Sättigungstransfer (Sättigungszeit 5 s), Filter für die transversale Relaxation ( $T_2$ ) mit Präsaturierung ( $\tau_{lock}$  1,2 s) und Gradienten selektierten 2D COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren mit Präsaturierung wurden nach der Methode von Mäki et al. [173] und Virta et al. [174] durchgeführt. Für die Zeitverlaufsstudien wurden die Dipeptide und Methylglyoxal mit 375  $\mu$ l Natriumphosphatpuffer (100 mmol/l, pH 7,4) und 125  $\mu$ l  $D_2O$  mit Trimethylsilylpropanionsäure auf eine finale Konzentration von 50 mmol/l und ein Volumen von 500  $\mu$ l gebracht.

#### **3.2.4. Statistische Auswertung**

Alle Experimente wurden mindestens mit einem Stichprobenumfang von  $n = 3$  durchgeführt. Ein p-Wert von 5 % wurde als signifikant, von 1 % als sehr signifikant und von 0,1 % als hoch signifikant betrachtet. Zur statistischen Analyse wurde ein zweiseitiger Student's t-test, und für den Glukose- und Insulintoleranztest ein *generalized additive mixed model* (GAMM) verwendet. Die Effektgrafiken basieren auf R [175]. Fehlerangaben bezeichnen die Standardabweichung des Mittelwerts. Relative Unterschiede in der Genexpressionsanalyse sind als Mittelwert mit Spanne der Werte angegeben. Die Effekte von Carnosin, Anserin, und deren Kombinationen wurden mit multipler Regression analysiert. Post-hoc-Vergleiche wurden über die Methode der kleinsten Quadrate mit Dunnett's Kontrasten, die in Lenth implementiert waren, durchgeführt [176].

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Rolle und Funktionalität des renalen Carnosinmetabolismus und dessen Veränderungen in Mäusen mit einem globalen *Cndp1*-Knockout**

#### **4.1.1. Carnosinase-Aktivität**

Die Carnosinase-Aktivität wurde in 11 und 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen beider Geschlechter und altersgleichen Wildtyp-Kontrollen in Gehirn, Leber, Niere, Muskel, Lunge, Herz, Serum und Pankreas gemessen. Nur in den Nieren der Mäuse konnte eine Carnosinase-Aktivität nachgewiesen werden. In den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war diese im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypmäusen um 80 % reduziert (Abbildung 1). Die Restaktivität von 20 % konnte nur unter



supraphysiologischen Substratkonzentrationen von 1 mmol/l und nicht bei niedrigeren Konzentrationen gemessen werden. Zusätzlich konnte sie mit Bestatin, einem Inhibitor der cytosolischen unspezifischen Carnosinase 2 (CN2), vollständig unterdrückt werden (Abbildung 1). Die Carnosinase-Aktivität war für beide Geschlechter eines Genotyps nicht unterschiedlich. Die Reduktion der Carnosinase-Aktivität lag bei männlichen *Cndp1*-Knockoutmäusen bei 90 % (Abbildung 2) und bei weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen bei 70 % im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkontrollen.

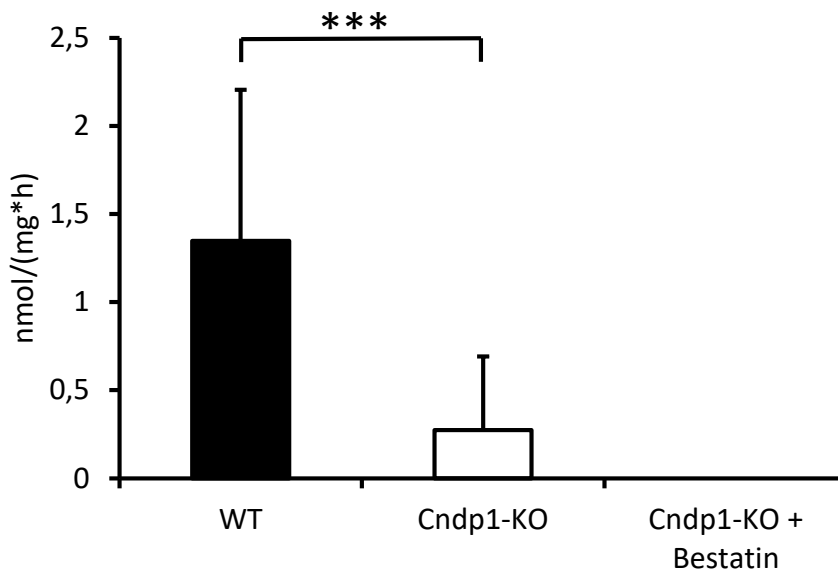


Abbildung 1: Carnosinase-Aktivität im Nierengewebe 11 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 8) und Wildtypmäuse (n = 14). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*\*: p < 0,001.

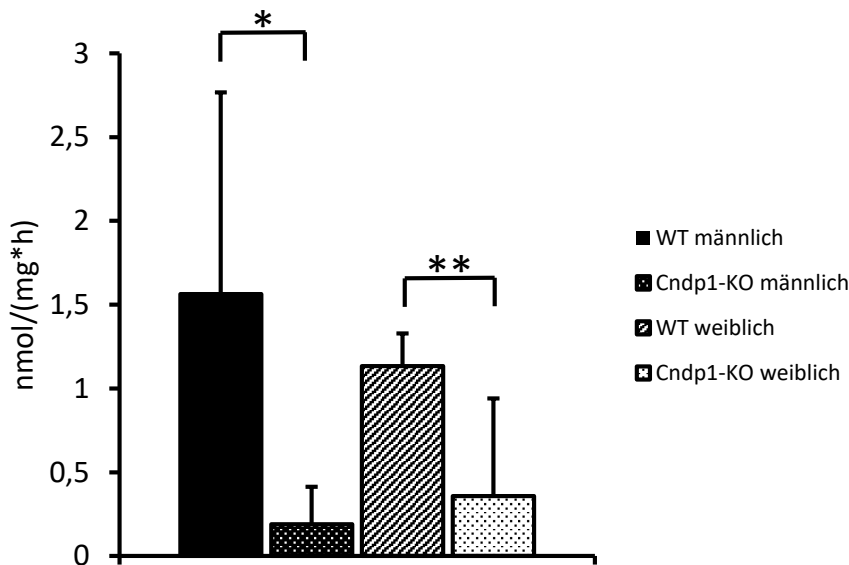


Abbildung 2: Carnosinase-Aktivität im Nierengewebe 11 Wochen alter männlicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 4) und männlicher Wildtypmäuse (n = 7) sowie 11 Wochen alter weiblicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 4) und weiblicher Wildtypmäuse (n = 7). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01.

Auch in der Gruppe der 55 Wochen alten Mäuse war die renale Carnosinase-Aktivität in den *Cndp1*-Knockoutmäusen um etwa 80 % im Vergleich zu den Wildtyptieren reduziert (Abbildung 3). In männlichen *Cndp1*-Knockoutmäusen war die Carnosinase-Aktivität auf 15 % (Abbildung 4) und in weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen auf 20 % im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkontrollen verringert. Einen geschlechtsspezifischen Unterschied gab das dagegen nicht. Bei den Wildtyptieren nahm die Aktivität mit dem Alter zu und war bei den 55 Wochen alten Tieren 1,5-fach erhöht und in den männlichen Wildtyptieren sogar nahezu verdoppelt. Bei den *Cndp1*-Knockoutmäusen war die Carnosinase-Aktivität zwischen 11 und 55 Wochen alten Tieren nicht verschieden.

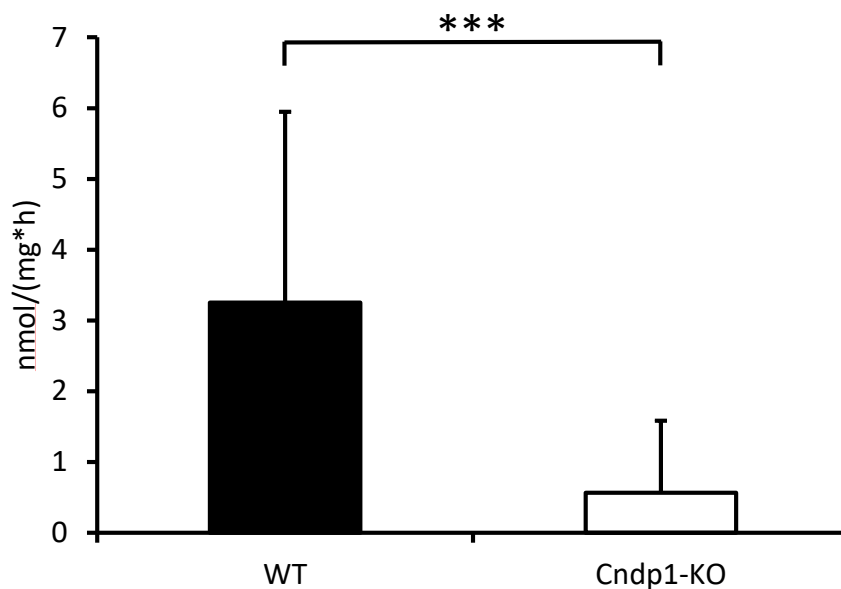


Abbildung 3: Carnosinase-Aktivität im Nierengewebe 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 14) und Wildtypmäuse (n = 14). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

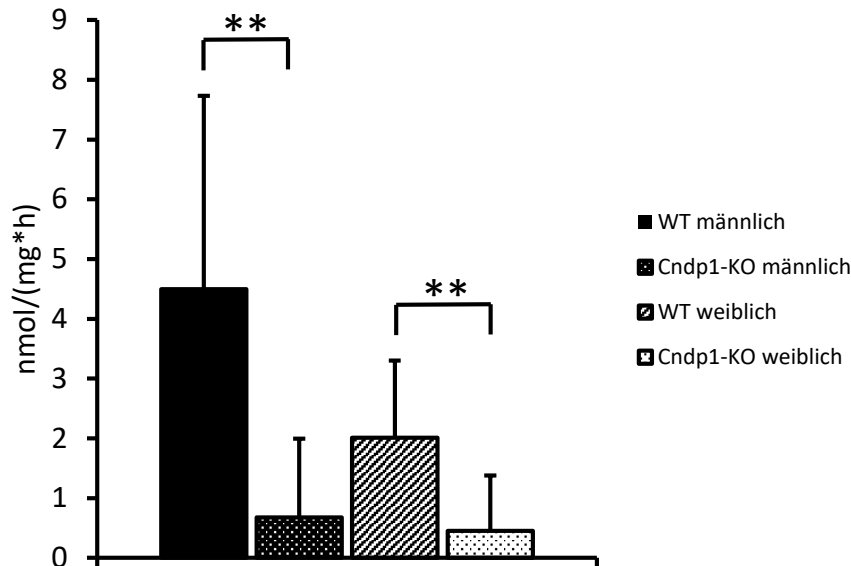


Abbildung 4: Carnosinase-Aktivität im Nierengewebe 55 Wochen alter männlicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 7) und Wildtypmäuse (n = 7) sowie 55 Wochen alter weiblicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 7) und weiblicher Wildtypmäuse (n = 7). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01.

#### 4.1.2. Carnosin- und Anserinkonzentrationen

##### 4.1.2.1. Carnosin- und Anserinkonzentration in der Niere

Die erniedrigte renale Carnosinase-Aktivität führte in den 11 und 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen zu einem deutlichen Anstieg der Carnosin- und Anserinkonzentrationen in der Niere im Vergleich zu den Wildtyptieren. In 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war die renale Carnosin- ebenso wie die renale Anserinkonzentration um das 2-Fache erhöht (Abbildung 5). Eine Konzentrationserhöhung wurde bei beiden Geschlechtern festgestellt. In männlichen *Cndp1*-Knockoutmäusen war verglichen mit den männlichen Wildtypkontrollen Carnosin auf das 1,2-Fache und Anserin auf das 1,6-Fache erhöht (Abbildung 6). In den weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen war die Carnosinkonzentration auf das 5-Fache und die Anserinkonzentration auf das 1,3-Fache im Vergleich zu den Wildtypkontrollen gesteigert (Abbildung 7).

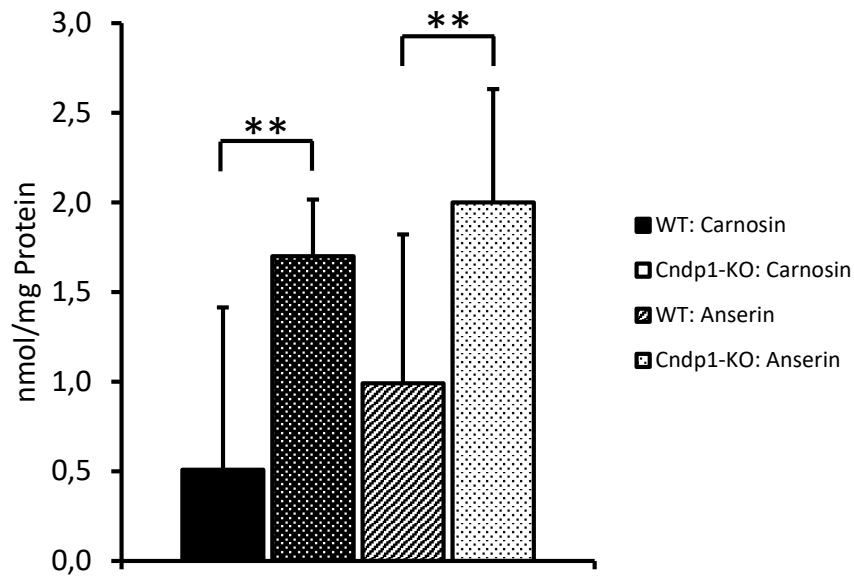


Abbildung 5: Carnosin- und Anserinkonzentrationen im Nierengewebe 11 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 8) und Wildtypmäuse (n = 14). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01.

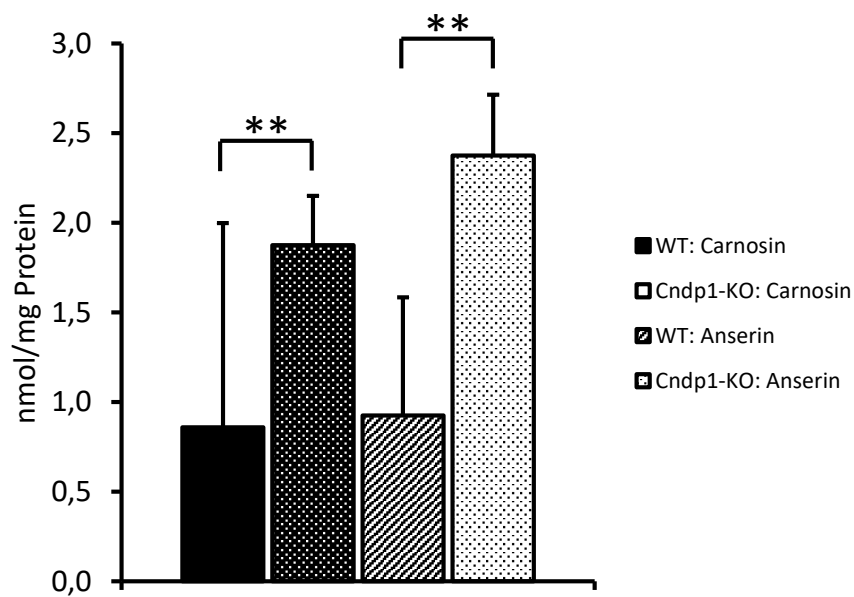
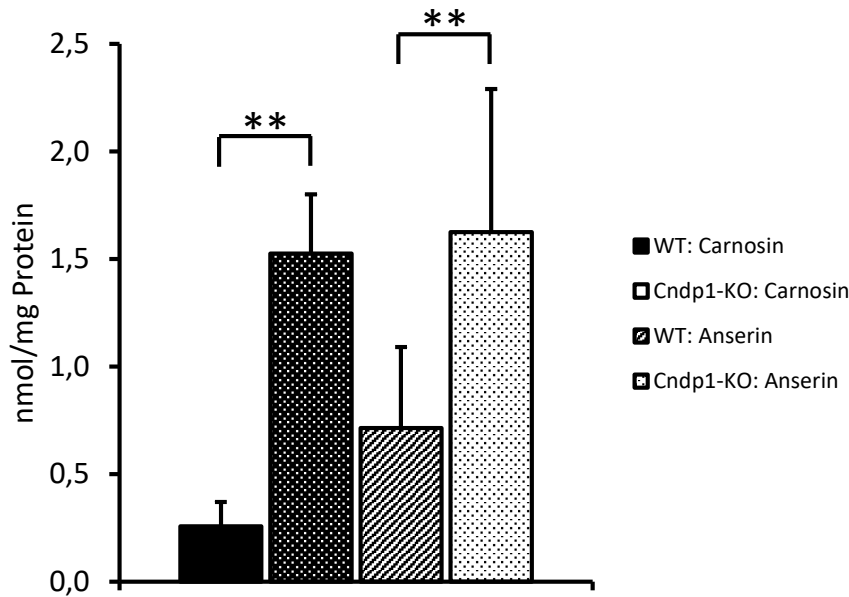


Abbildung 6: Carnosin- und Anserinkonzentrationen im Nierengewebe 11 Wochen alter männlicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 4) und Wildtypmäuse (n = 7). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01.



**Abbildung 7:** Carnosin- und Anserinkonzentrationen im Nierengewebe 11 Wochen alter weiblicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 4) und Wildtypmäuse (n = 7). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01.

Auch in 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war die renale Carnosinkonzentration um den Faktor 2 und die renale Anserinkonzentration um den Faktor 8 signifikant erhöht (Abbildung 8). Die Anserinkonzentration war dabei in beiden Geschlechtern in ähnlichem Maße verändert (Abbildung 9 und Abbildung 10). Die renale Konzentration von Carnosin war dagegen nur in den weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen um den Faktor 10 signifikant erhöht (Abbildung 10). Bei den männlichen *Cndp1*-Knockoutmäusen war sie im Vergleich zu den männlichen Wildtyptieren unverändert (Abbildung 9).

In den 55 Wochen alten Wildtypkontrollen war die renale Anserinkonzentration im Vergleich zu 11 Wochen alten Wildtypmäusen um 90 % reduziert, während die renale Carnosinkonzentration unverändert war. In den *Cndp1*-Knockoutmäusen sank die renale Anserinkonzentration signifikant um 60 % und die renale Carnosinkonzentration um 80 % (vgl. Abbildung 5 und Abbildung 8).

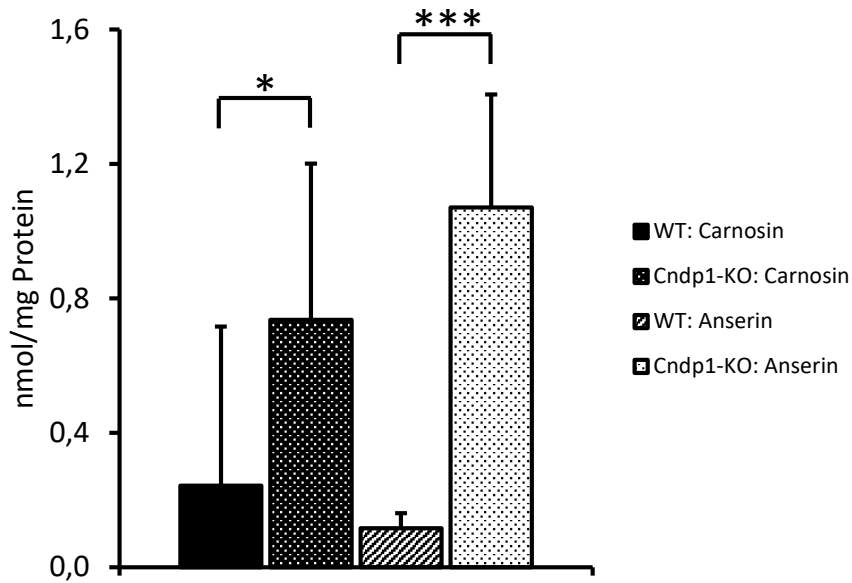


Abbildung 8: Carnosin- und Anserinkonzentrationen im Nierengewebe 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 14) und Wildtypmäuse (n = 14). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*: p < 0,05; \*\*\*: p < 0,001.

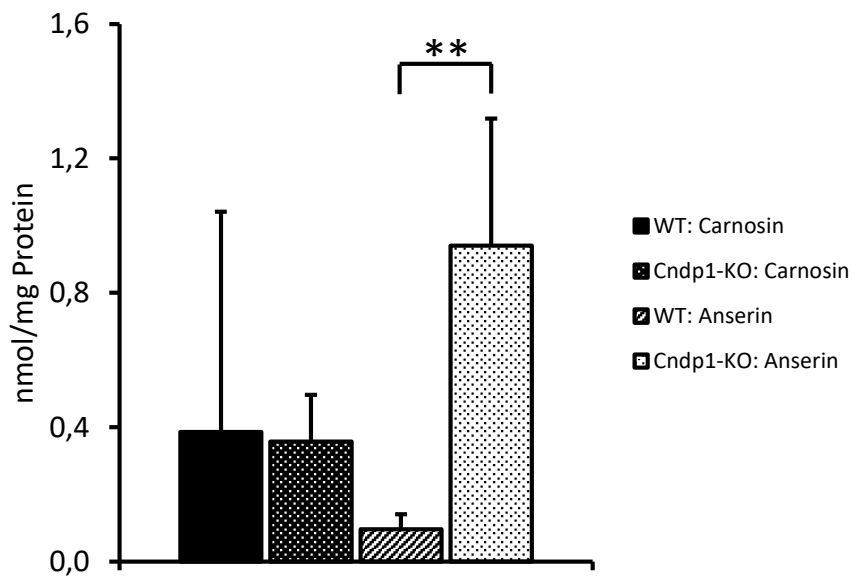


Abbildung 9: Carnosin- und Anserinkonzentrationen im Nierengewebe 55 Wochen alter männlicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 7) und Wildtypmäuse (n = 7). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01.

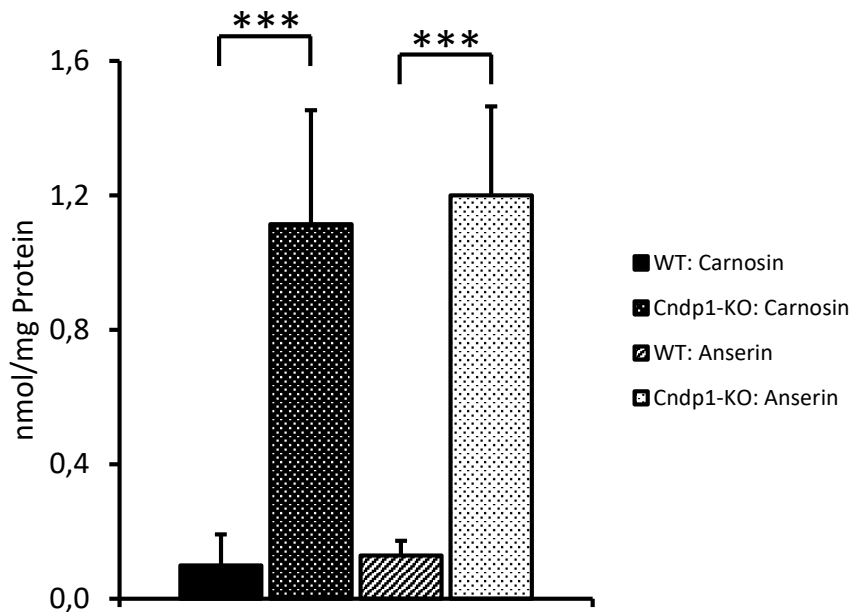


Abbildung 10: Carnosin- und Anserinkonzentrationen im Nierengewebe 55 Wochen alter weiblicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 7) und Wildtypmäuse (n = 7). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*\*:  $p < 0,001$ .

#### 4.1.2.2. Carnosin- und Anserinkonzentrationen in anderen Organen

Carnosin und Anserin konnte in allen untersuchten Geweben (Muskel, Gehirn, Leber, Herz, Lunge und Serum) detektiert werden (Abbildung 11 und Abbildung 12). Unterschiedliche Gewebe waren durch unterschiedliche Konzentrationen und Quotienten von Carnosin zu Anserin gekennzeichnet. Die höchsten Konzentrationen fanden sich im Muskelgewebe, unabhängig von Geschlecht und Alter, in allen anderen Geweben waren sie dagegen um ein Vielfaches niedriger. Die höchste Differenz zwischen Anserin und Carnosin wurde im Gehirn gemessen, mit dem größten Unterschied in 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen, bei denen die Carnosinkonzentration 10-fach höher war als die Anserinkonzentration (Abbildung 11 und Abbildung 12). Die Auswirkungen der globalen *Cndp1*-Defizienz auf andere Gewebe, außer der Niere, waren gering und resultierten ausschließlich in einer Verminderung, nicht aber Erhöhung, der Anserin- und Carnosinkonzentrationen. In den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war die Anserinkonzentration im Muskel um 25 % erniedrigt. In den weiblichen 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war zusätzlich auch die Carnosinkonzentration im Muskel im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkontrollen reduziert. Auch die Anserinkonzentrationen im Herz und in der Leber waren um 30 % bzw. 40 % reduziert. Die Ausgangskonzentrationen in den 11 Wochen

alten Wildtypmieren waren jedoch äußerst gering. In den 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war die Carnosin bzw. Anserinkonzentration ausschließlich in den Nieren deutlich erhöht, in alle anderen Organen unterschieden sich diese nicht von den entsprechenden Wildtypkontrollen.

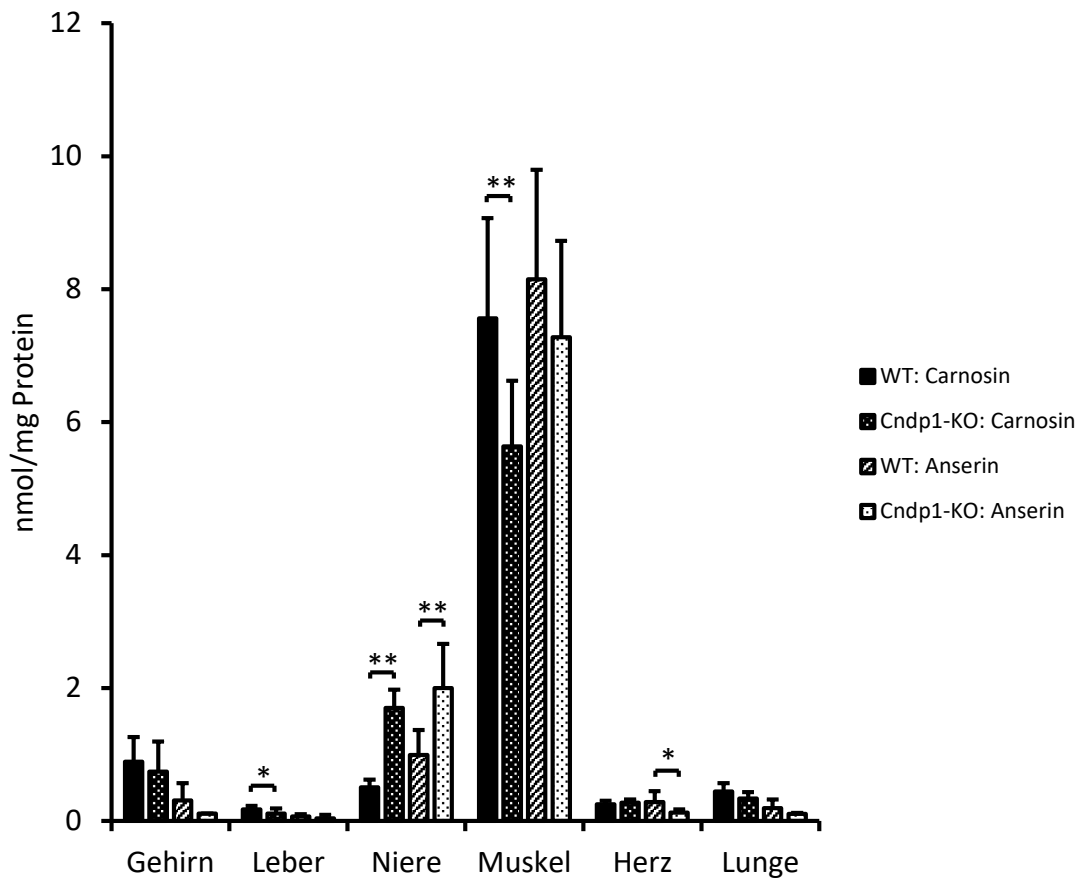


Abbildung 11: Carnosin- und Anserinkonzentrationen in verschiedenen Organen (Gehirn, Leber, Niere, Muskel, Herz, Lunge) 11 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 8) und Wildtypmäuse (n = 14). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*: p < 0,05; \*\* p < 0,01.



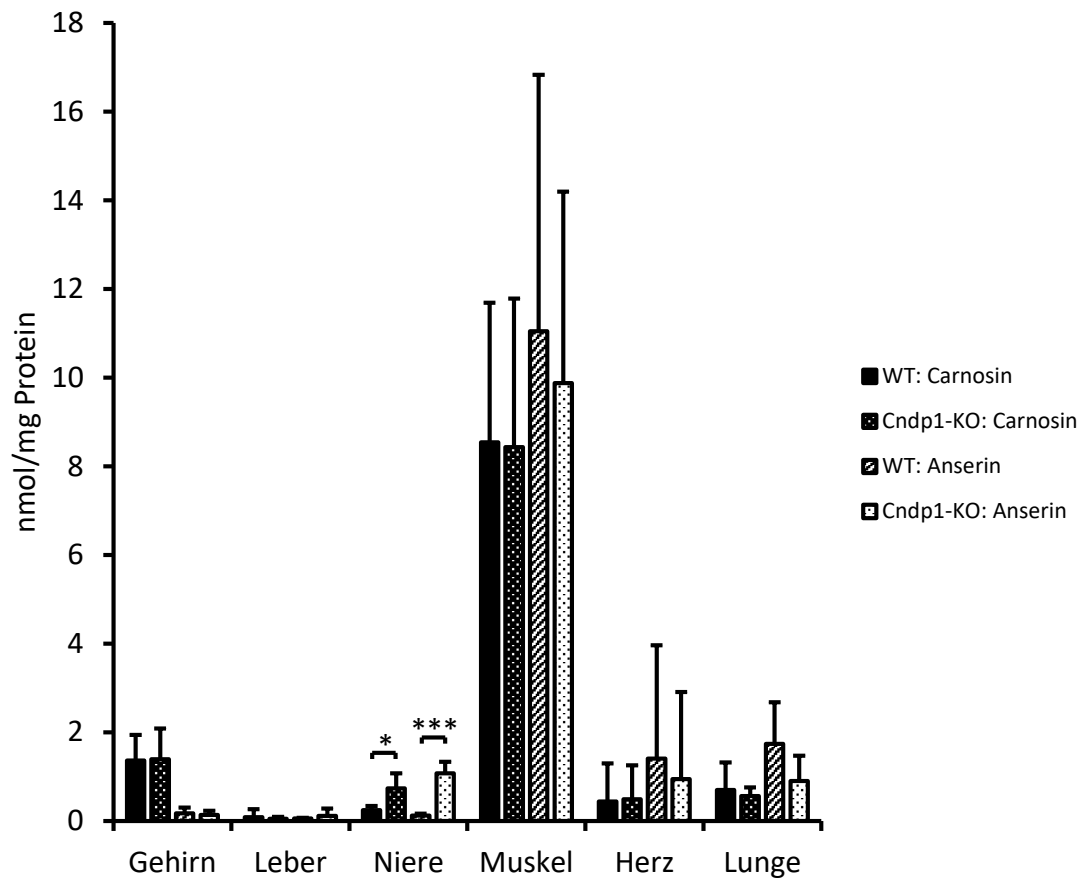


Abbildung 12: Carnosin- und Anserinkonzentrationen in verschiedenen Organen (Gehirn, Leber, Niere, Muskel, Herz, Lunge) 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 14) und Wildtypmäuse (n = 14). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*: p < 0,05; \*\*\* p < 0,001.

#### 4.1.3. Lokalisierung von Carnosin und Anserin in der Niere

Die erhöhten renalen Carnosin- und Anserinwerte in den *Cndp1*-Knockoutmäusen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen anhand der HPLC-Bestimmung konnten mittels MALDI-MSI bestätigt werden (Abbildung 13). Carnosin und Anserin sind vor allem im renalen Cortex lokalisiert.

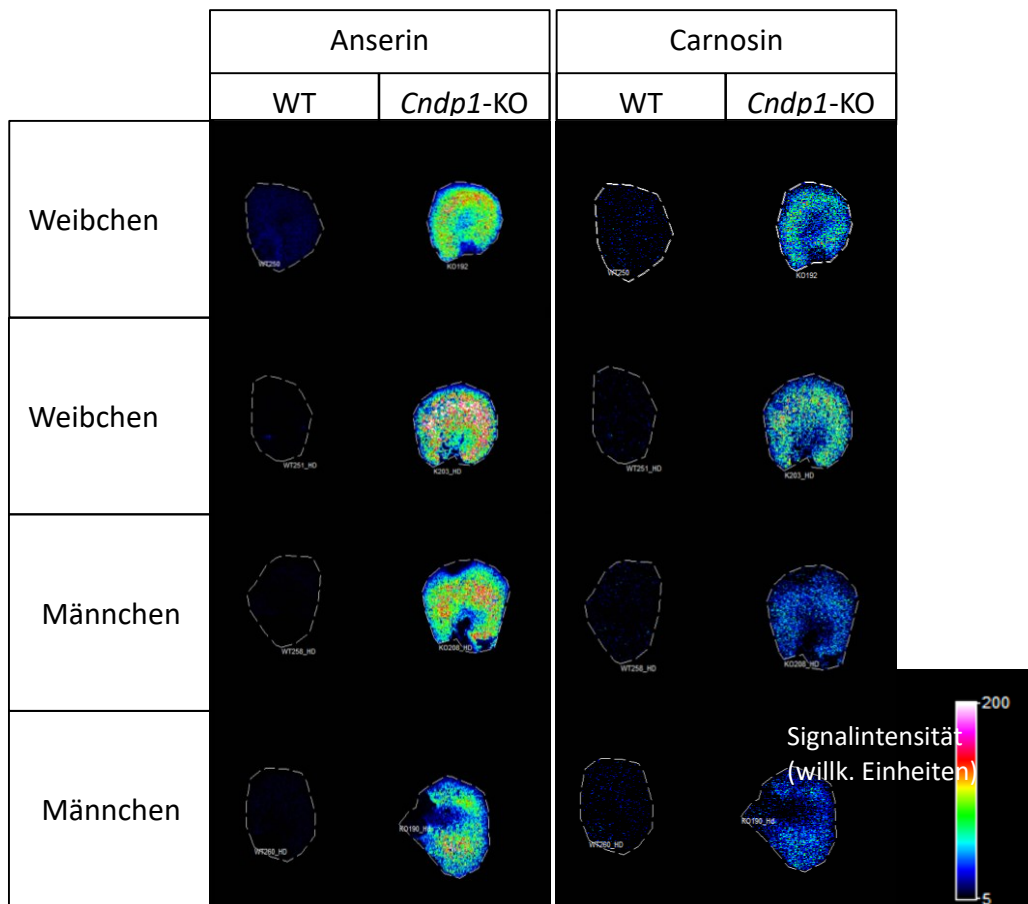


Abbildung 13: Lokalisierung von Carnosin und Anserin im Nierengewebe 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 4) und Wildtypmäuse (n = 4) über MALDI-MSI.

## 4.2. Funktionalität und Morphologie der Niere bei globaler *Cndp1*-Defizienz

### 4.2.1. Glomeruläre Filtrationsrate

Als Parameter der Nierenfunktionalität wurde die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) über die Eliminierung von FITC-Sinistrin aus dem Blut bestimmt. Die GFR unterschied sich zwischen 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen und den entsprechenden Wildtypkontrollen nicht (Abbildung 14).

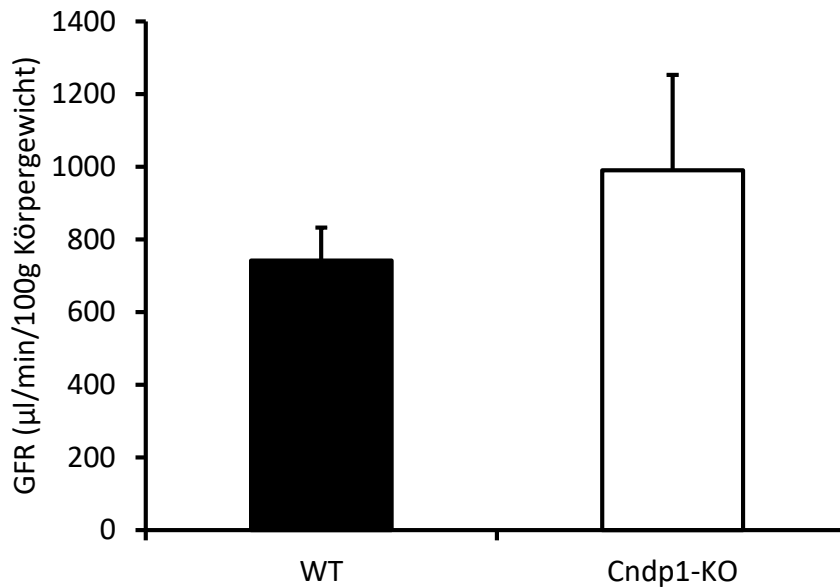


Abbildung 14: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bei 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen (n = 11) und Wildtypmäusen (n = 4). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

#### 4.2.2. Urinäre Albumin- und Creatininspiegel

Als Maß für die Proteinurie wurde Albumin im Spontanurin der 55 Wochen alten Tiere verglichen. Das Verhältnis von Albumin zu Creatinin, das als Konstante zur Normalisierung diente, war zwischen den beiden untersuchten Gruppen nicht signifikant verschieden (Abbildung 15).

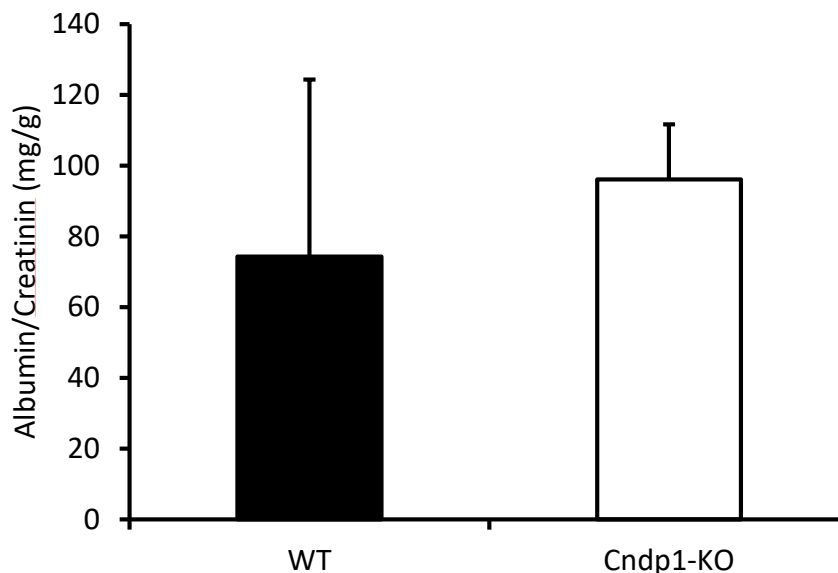


Abbildung 15: Albumin-zu-Creatinin-Quotient im Spontanurin 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 4) und Wildtypmäuse (n = 4). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 4.2.3. Histologische Färbungen

Histologische Präparate von Nierengewebe von 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypkontrollen wurden mit HE und SFOG angefärbt sowie der PAS-Reaktion unterzogen und sowohl densitometrisch als auch mikroskopisch nach pathologischen Kriterien evaluiert. In der densitometrischen *in silico*-Auswertung konnte bei den *Cndp1*-Knockoutmäusen kein Unterschied in der Deposition von PAS-positivem Material zu den Wildtypmäusen in den Glomeruli festgestellt werden (Abbildung 16). Darüber hinaus konnten keine pathologischen Veränderungen detektiert werden. Weder eine Verdickung der Basalmembran noch eine Hypertrophie des Mesangiums, der Verlust von Podozyten oder Veränderungen im Bereich der Blutgefäße (Abbildung 17). Zusätzlich wurden Präparate von Leber und Muskel angefärbt. Auch hier war kein Unterschied zwischen den Genotypen, bzw. auch keine pathologische Veränderung im Allgemeinen sichtbar.

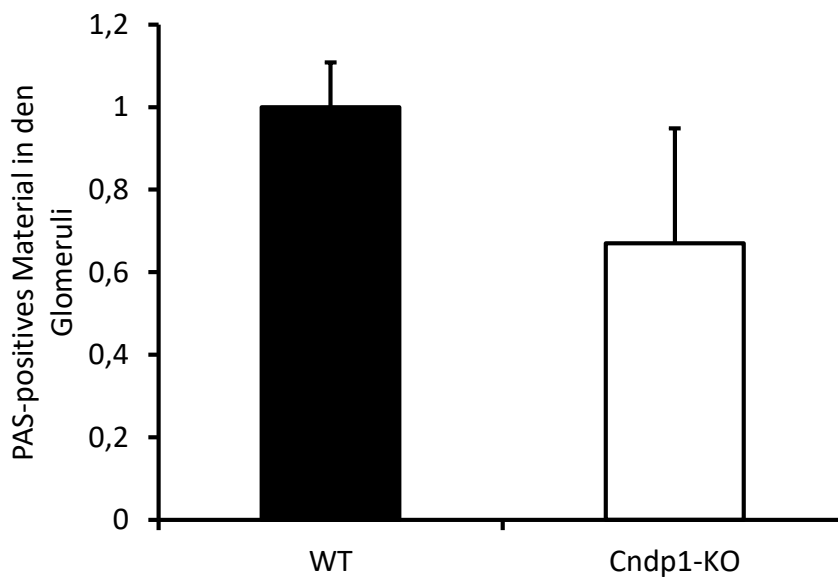


Abbildung 16: Densitometrische Auswertung der Deposition von PAS-positivem Material in den Glomeruli von *Cndp1*-Knockoutmäusen (n = 4) relativ zu Wildtypmäusen (n = 4). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

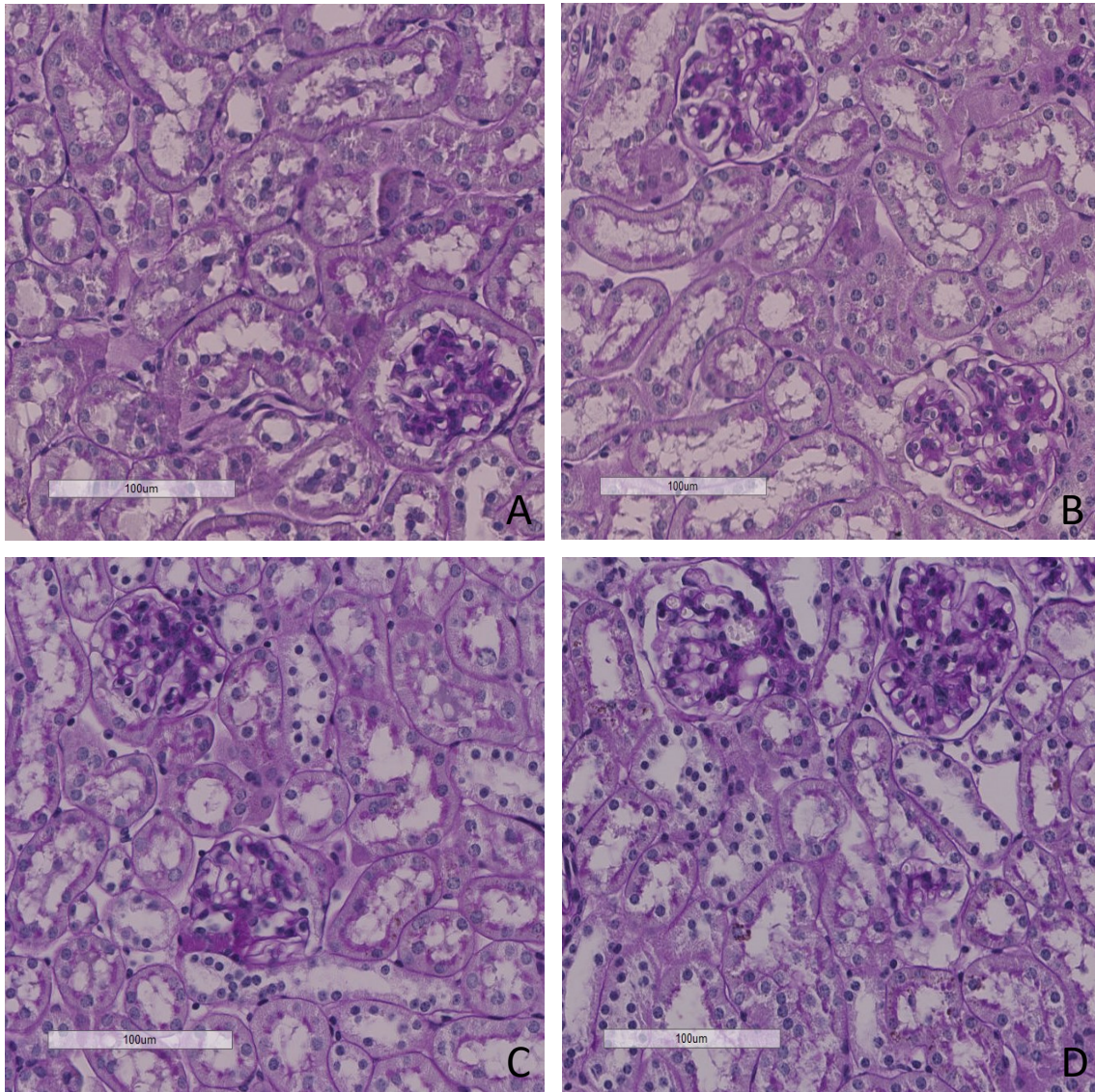


Abbildung 17: PAS-Reaktion im Nierengewebe von 55 Wochen alten männlichen (A) und weiblichen (B) *Cndp1*-Knockoutmäusen sowie männlichen (C) und weiblichen (D) Wildtypmäusen. Pro Genotyp wurden 4 Tiere ausgewertet und je ein repräsentativer Schnitt selektiert.

#### 4.2.4. Aminosäure-Konzentrationen

In 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war die Konzentration von Asparagin um 28 % (Abbildung 18), von Glutamin um 45 % und von Serin um 30 % in den Nieren im Vergleich zu den Wildtypmäusen reduziert. Die Konzentration von  $\beta$ -Alanin war weder im Muskel (Abbildung 20), noch in den Nieren sowie im Serum bei den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockouttieren verändert. In 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war nur die Argininkonzentration in den Nieren um 17 % reduziert (Abbildung 19).

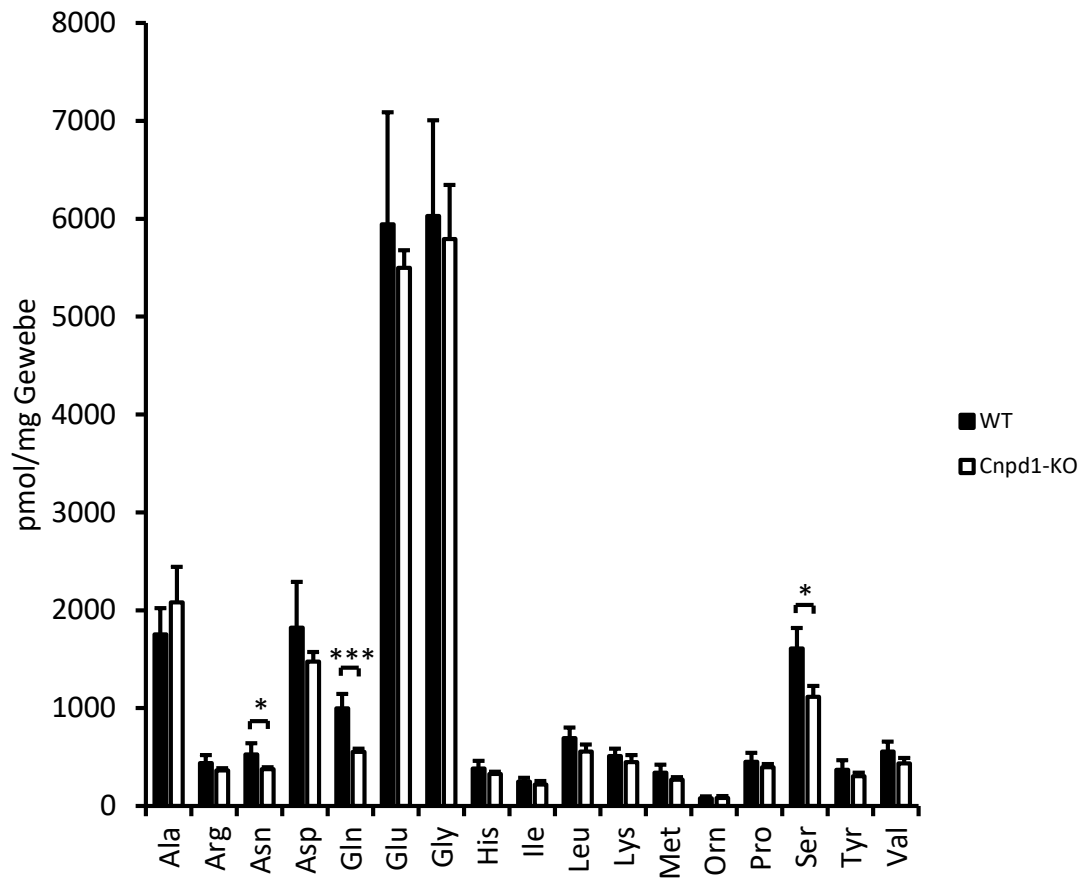


Abbildung 18: Aminosäurekonzentrationen im Nierengewebe 11 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 4) und Wildtypmäuse (n = 4). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*: p < 0,05; \*\*\*: p < 0,001.

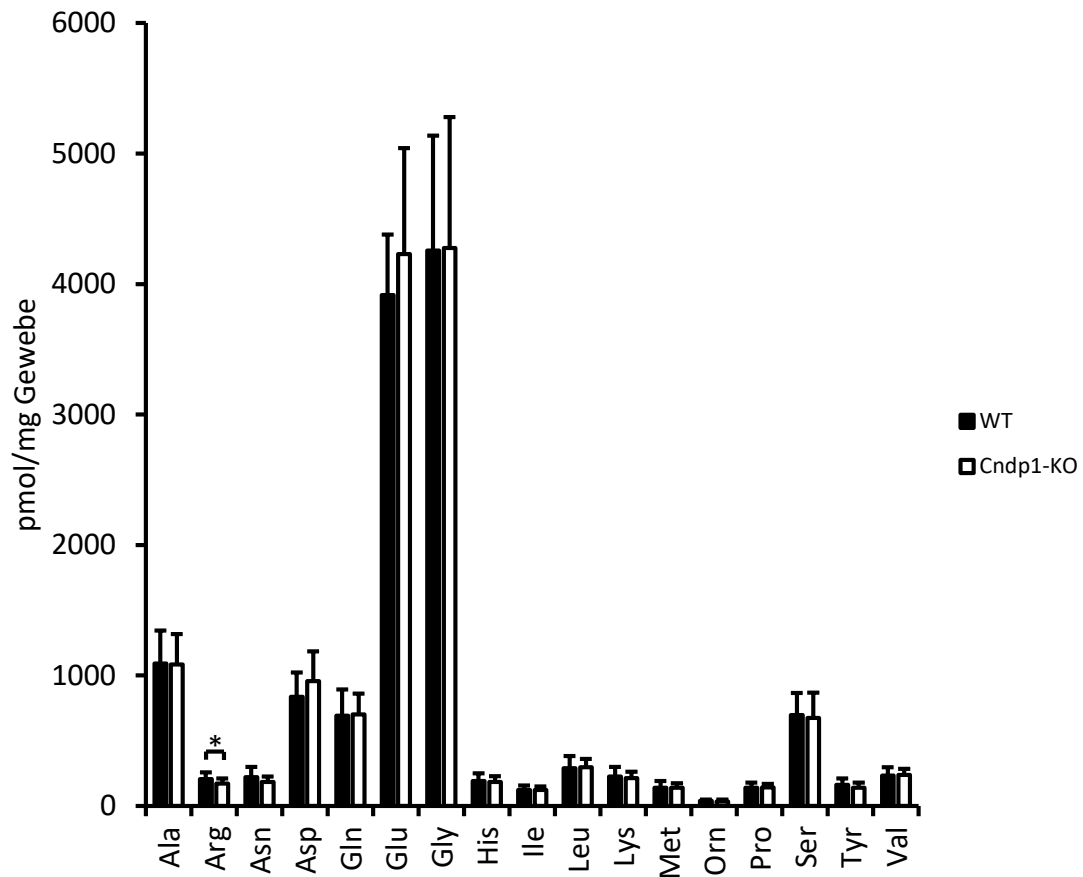


Abbildung 19: Aminosäurekonzentrationen im Nierengewebe 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 14) und Wildtypmäuse (n = 14). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*: p < 0,05.

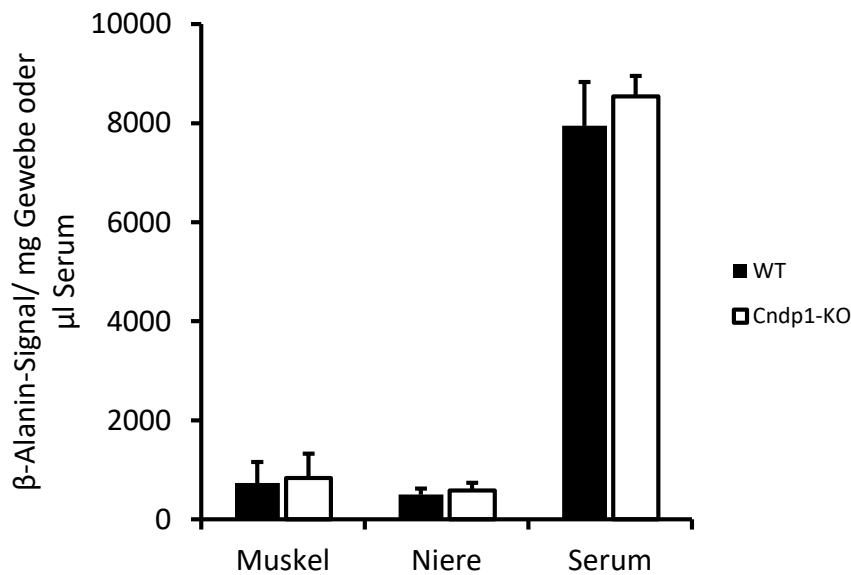


Abbildung 20:  $\beta$ -Alanin-Signal in Muskel, Niere und Serum von 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen (n = 5) und Wildtypmäusen (n = 5). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 4.3. Wirkungsmechanismen von Carnosin und Anserin auf Carbonyl- und oxidativen Stress *in vitro*

#### 4.3.1. Interaktion von Carnosin und Anserin mit Methylglyoxal

Um potenziell protektive Effekte hoher Carnosin- und Anserinkonzentrationen in den *Cndp1*-Knockoutmäusen abschätzen zu können, wurde die Wirkung auf Auslöser diabetischer Spät komplikationen wie das reaktive Carbonyl Methylglyoxal (MG) *in vitro* untersucht.

Die parallele Inkubation von Carnosin und Anserin sowie dem Methylglyoxal-Fänger N<sup>ε</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin mit Methylglyoxal führte in allen drei Varianten zu einem Anstieg der gemessenen Absorption bei 336 nm über den Messzeitraum (Abbildung 21). Für Anserin und N<sup>ε</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin konnten hierbei vergleichbare Absorptionswerte ermittelt werden, während die Messwerte für die Inkubation von Carnosin mit Methylglyoxal deutlich höher waren. In der optischen Betrachtung der Reaktionsansätze und in der Wiederholung bei pH-Werten von 5,4 bzw. 9,4 konnte eine deutliche Braunfärbung der Ansätze über die Zeit festgestellt werden, die in Abhängigkeit vom pH-Wert bei pH 9,4 ihre größte Intensität erreichte und bei pH 5,4 am schwächsten war (Abbildung 22).

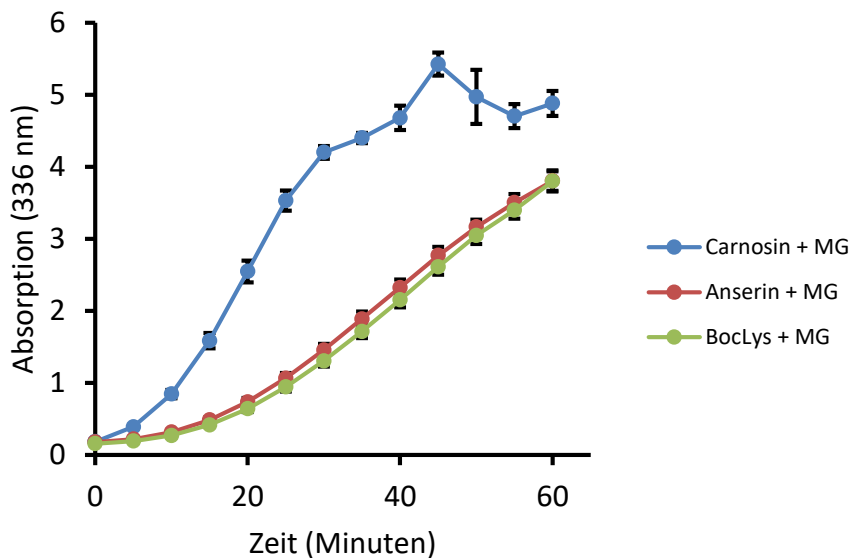


Abbildung 21: Abfangen von Methylglyoxal (MG) durch Carnosin, Anserin und die Kontrolle N<sup>ε</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin (BocLys) repräsentiert durch die Absorption bei 336 nm (jeweils n = 4). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.



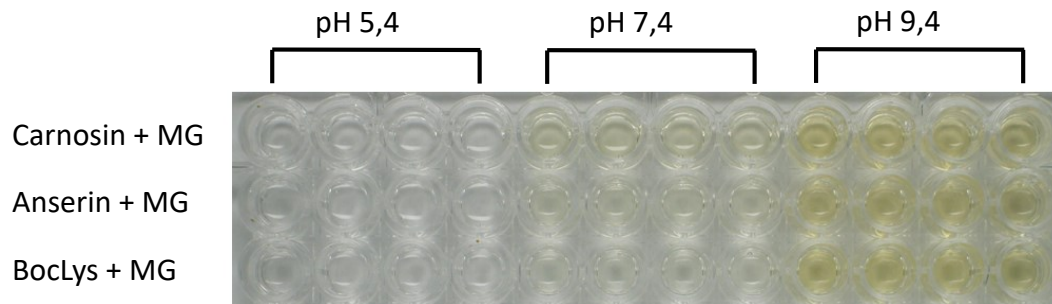


Abbildung 22: Abfangen von Methylglyoxal (MG) durch Carnosin, Anserin und die Kontrolle N<sup>ε</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin (BocLys) in Abhängigkeit von unterschiedlichen pH-Werten.

Die Inkubation von Carnosin und Anserin mit Methylglyoxal in zellfreier Umgebung und anschließende Analyse über NMR zeigte, dass nur eine transiente Bildung von Carnosin-MG- und Anserin-MG-Addukten erfolgt und das auch nur in geringen Konzentrationen. Daher konnten diese Carnosin- bzw. Anserin-MG-Spezies nicht zur weiteren Analyse isoliert werden. Der Hauptteil der Histidindipeptide blieb nach der Reaktion unverändert, während für Methylglyoxal ein großer Anteil unterschiedlicher Methylglyoxal-Oligomere und -Polymere mit hoher Molekülmasse detektiert wurde. Die Co-Inkubation von Methylglyoxal mit N<sup>ε</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin und Imidazol als Kontrollen führten zu einer vergleichbaren Bildung von Methylglyoxal-Oligomeren und -Polymeren wie sie durch Carnosin und Anserin zu beobachten waren. Die Zeit bis die Hälfte des eingesetzten Methylglyoxal verbraucht war betrug 0,6 Stunden für Carnosin, 2,4 Stunden für Anserin und 5,8 Stunden für N<sup>ε</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin.

#### 4.3.2. Effekt von Carnosin und Anserin auf Proteinmodifikationen durch Methylglyoxal

Die Reaktion von Methylglyoxal mit humanem Albumin über einen Zeitraum von 24 Stunden konnte durch Zugabe von Carnosin und Anserin signifikant reduziert werden. Während für Carnosin mindestens ein molares Verhältnis von 100 : 1 zu Methylglyoxal notwendig war (Abbildung 23), musste für Anserin eine 200-fach höhere Konzentration eingesetzt werden, um die Bildung von AGEs durch Methylglyoxal zu verringern. Um die AGE-Bildung um 50 % zu verringern, war für Carnosin ein Überschuss von 400 : 1 und für Anserin von 700 : 1 nötig. In der speziellen Betrachtung des AGE N<sup>ε</sup>-(Carboxyethyl)-lysin (CEL) per Western Blot konnte ebenso eine konzentrationsabhängige Reduktion durch Zugabe von Carnosin und Anserin gezeigt werden (Abbildung 24). Die benötigten

Überschüsse für einen signifikanten Effekt lagen bei 20 : 1 für Carnosin und 10 : 1 zu Methylglyoxal für Anserin.

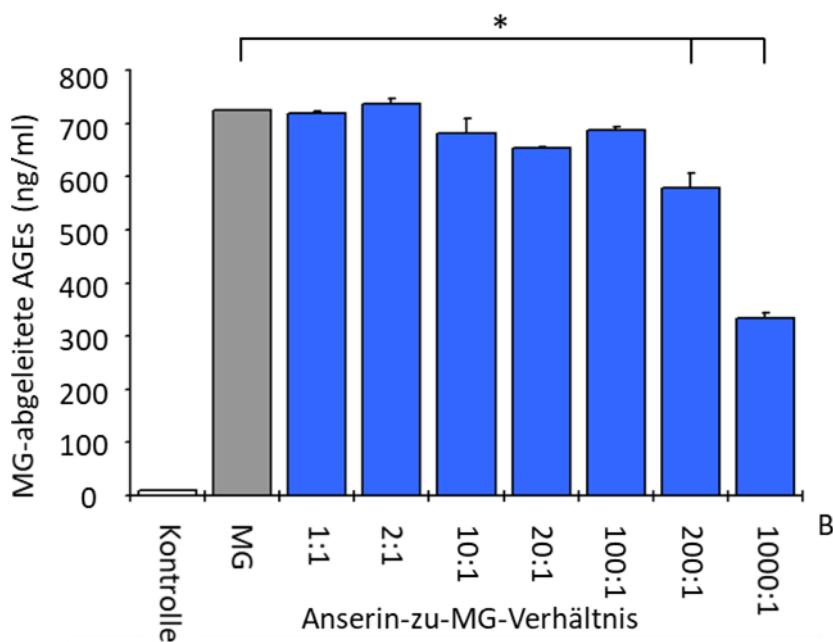
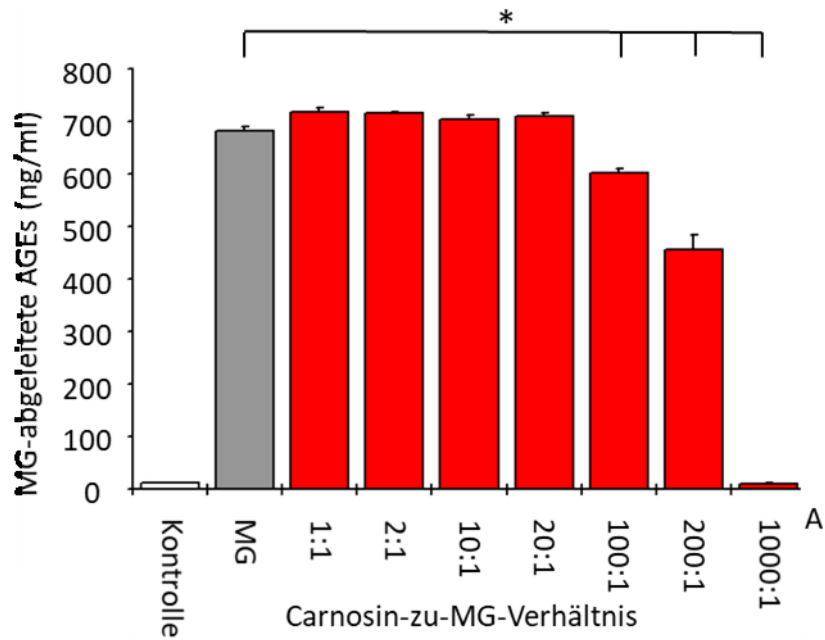
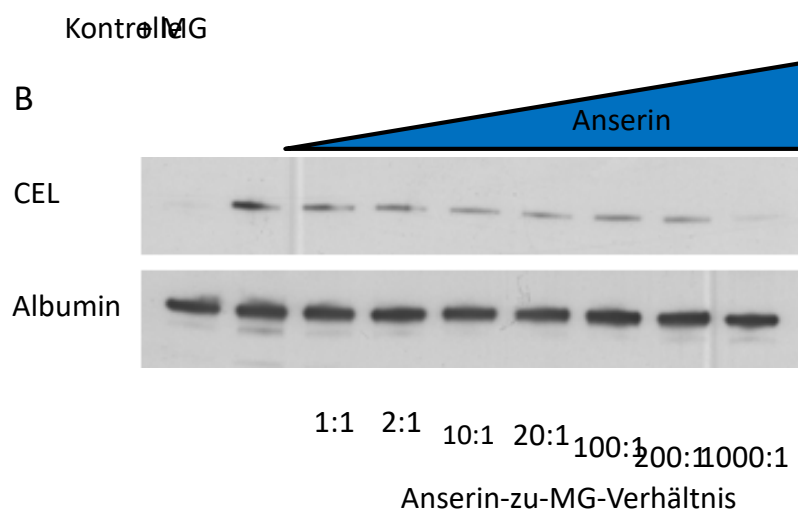
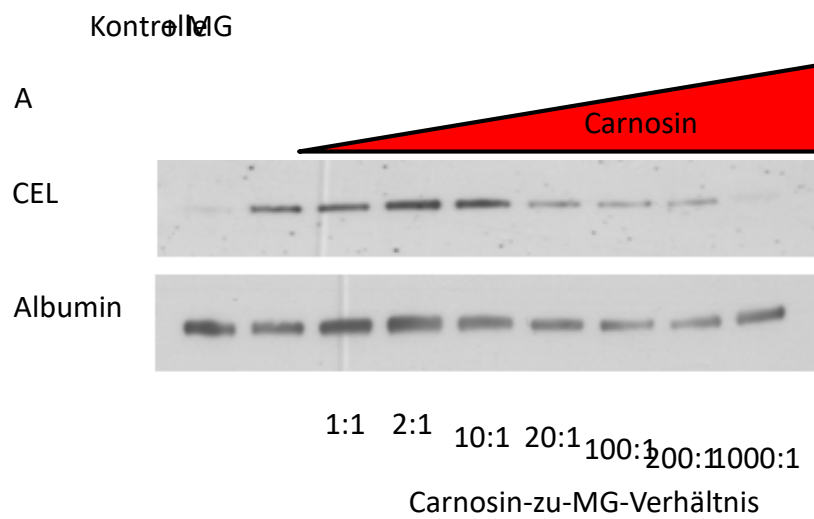


Abbildung 23: Einfluss von ansteigenden Carnosin- (A) und Anserinkonzentrationen (B) auf die Bildung von *advanced glycation endproducts* (AGEs) aus humanem Albumin durch Methylglyoxal (MG) mit jeweils n = 3. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*: signifikante Verminderung der AGE-Konzentration.



**Abbildung 24:** Einfluss von ansteigenden Carnosin- (A) und Anserinkonzentrationen (B) auf die Bildung von N<sup>ε</sup>-(Carboxyethyl)-lysin (CEL) aus humanem Albumin durch Methylglyoxal (MG). Jeder Western Blot wurde dreimal wiederholt und ein repräsentatives Experiment ausgewählt.

#### 4.3.3. Expression der Gene der Carnosintransporter in renalen Zellen

Um die *in vitro*-Experimente mit Carnosin-Inkubation vom zellfreien Medium auf renale Zellen auszuweiten wurde die Expression der Gene von Carnosintransportern ermittelt. Die Expression der potenziellen Carnosintransporter PEPT1, PEPT2, PHT1 und PHT2 sowie des Transporters TauT, der neben Taurin auch für die Aufnahme von  $\beta$ -Alanin zuständig ist, konnte in humanen Tubulusepithelzellen aufgezeigt werden (Abbildung

25). In murinen Mesangialzellen und Podozyten konnte jedoch nur die Expression von PHT1 und TauT nachgewiesen werden.

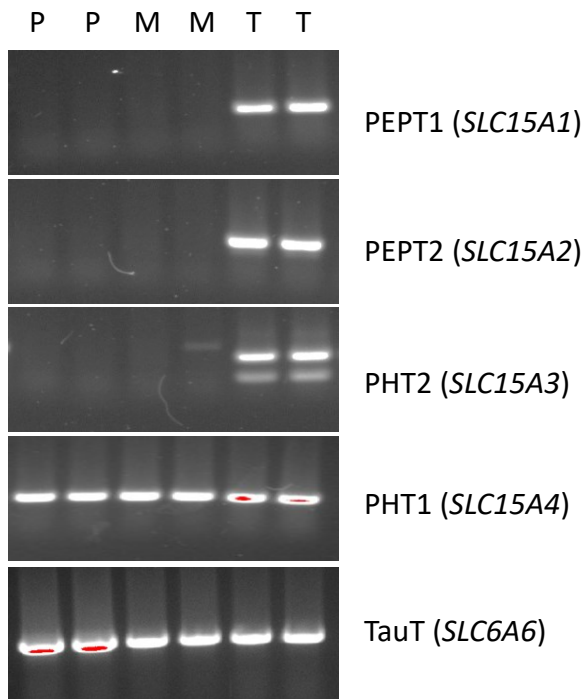


Abbildung 25: PCR-Analyse der Expression potenzieller Carnosintransporter (PEPT1, PEPT2, PHT2, PHT1) und des Taurintransporters (TauT) in murinen Mesangialzellen (M), humanen Tubulusepithelzellen (T) und murinen Podozyten (P). Begriffe in Klammern bezeichnen die zugehörigen Gene.

#### 4.3.4. Einfluss von Carnosin und Anserin auf renale Zellen

Die Zellviabilität der drei untersuchten renalen Zelltypen war jeweils in unterschiedlichem Maße durch Carnosin und Anserin beeinflusst. Podozyten zeigten die höchste Toleranz gegenüber Carnosin mit einer  $EC_{50}$  (mittlere effektive Konzentration) von 9,1 mmol/l. Bei Mesangial- und Tubulusepithelzellen wurden schon bei geringeren Konzentrationen toxische Effekte sichtbar, was sich in einer  $EC_{50}$  von 3,7 mmol/l bzw. 4,1 mmol/l widerspiegelte. Während die Zellviabilität der Mesangialzellen am stärksten von Carnosin beeinträchtigt wurde, war bei diesem Zelltyp die höchste Resistenz gegenüber Anserin nachweisbar. So betrug die  $EC_{50}$  von Anserin für diesen Zelltyp 6 mmol/l, für Podozyten 4,7 mmol/l und für die Tubulusepithelzellen lediglich 3,2 mmol/l.

#### 4.3.5. Effekt von Carnosin auf Proteinmodifikationen durch Carbonylstress in renalen Zellen

Im Experiment mit den Tubulusepithelzellen über einen Inkubationszeitraum von 6 Stunden konnte demonstriert werden, dass eine Inkubation mit sowohl 0,25 mmol/ als

auch 0,4 mmol/l Methylglyoxal zu einer vermehrten Bildung des Methylglyoxaladdukts Hydroimidazon (MG-H1) führt, die nicht durch Co-Inkubation mit 0,5 mmol/l Carnosin reduziert werden konnte (Abbildung 26).

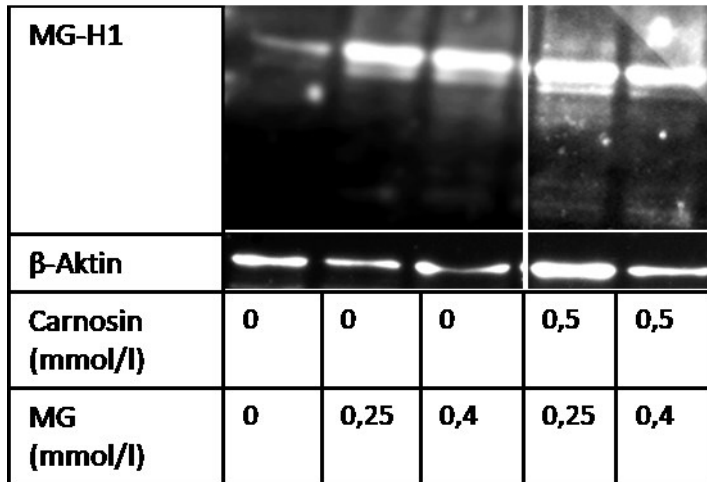


Abbildung 26: Einfluss von Carnosin auf die Bildung des Methylglyoxaladdukts Hydroimidazon (MG-H1) in Tubulusepithelzellen über 6 Stunden. Der Western Blot wurde dreimal wiederholt und ein repräsentatives Experiment ausgewählt.

#### 4.3.6. Effekt von Carnosin und Anserin auf die *HSPA1*-Expression bei oxidativem und Glukosestress

Die 24-stündige Inkubation von humanen Tubulusepithelzellen mit Anserin, nicht aber Carnosin, führte in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Hyperglykämie zu einer signifikant erhöhten Expression von *HSPA1* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 27).

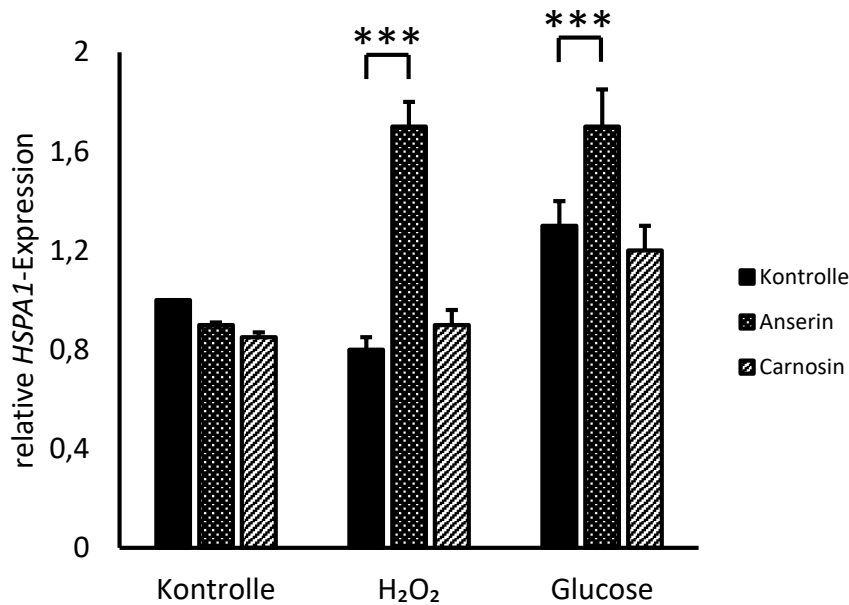


Abbildung 27: *HSPA1*-Expression in humanen Tubulusepithelzellen nach 24-stündiger Inkubation mit Anserin oder Carnosin (jeweils 1 mmol/l) und in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60 µmol/l) oder Glukose (36 mmol/l) relativ zur unbehandelten Kontrolle (jeweils n = 4). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*\*: p < 0,001.

#### 4.4. Protektive Mechanismen und Indikatoren von Carbonyl- und oxidativem Stress in der Niere bei *Cndp1*-Defizienz

##### 4.4.1. Glutathionmetabolismus in der Niere

Die Konzentrationen von reduziertem Glutathion (GSH), Glutathion-Disulfid (GSSG) bzw. Gesamt-Glutathion und  $\gamma$ -Glutamylcystein (Abbildung 28) sowie Cystein (Daten nicht gezeigt) waren zwischen 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypmäu- sen nicht verschieden. In der MALDI-MSI-Analyse waren GSH- und GSSG-Konzentration zwischen *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypmäusen ebenfalls nicht unterschiedlich und hauptsächlich im Nierenmark lokalisiert (Abbildung 29).

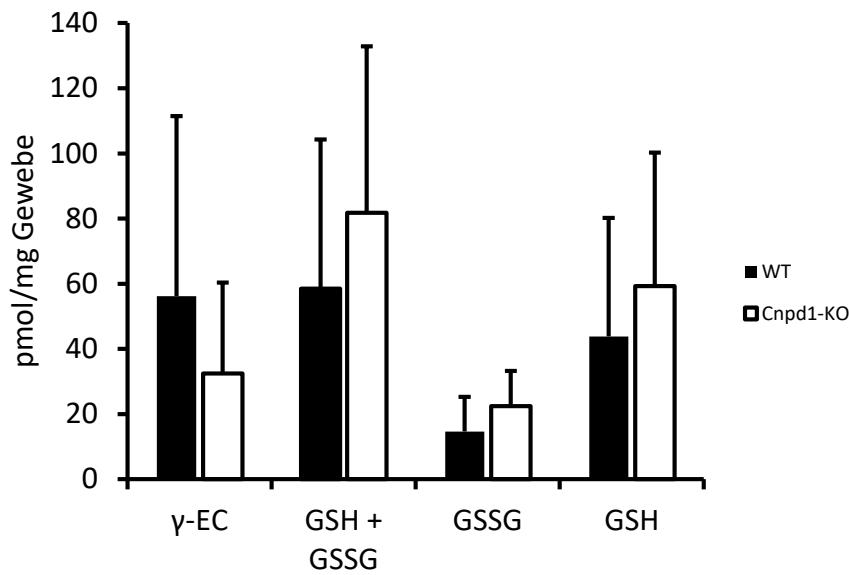


Abbildung 28: Konzentrationen von  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ -EC), reduziertem Glutathion (GSH), Glutathion-Disulfid (GSSG) und Gesamt-Glutathion im Nierengewebe 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 14) und Wildtypmäuse (n = 14). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

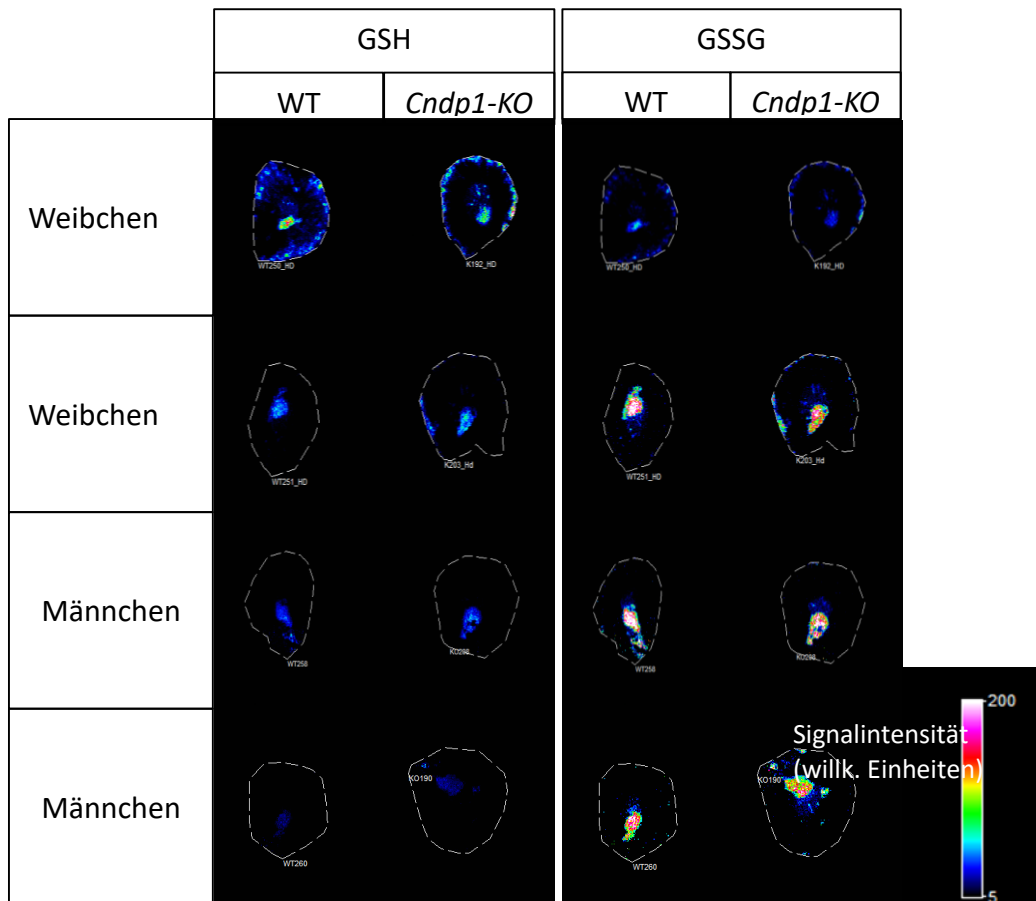


Abbildung 29: Lokalisierung von reduziertem Glutathion (GSH) und Glutathion-Disulfid (GSSG) im Nierengewebe 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 4) und Wildtypmäuse (n = 4) über MALDI-MSI.

#### 4.4.2. Genexpressionsanalyse in der Niere

Die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit oxidativem Stress und Entzündung stehen, wurde im Nierengewebe von 11 und 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen relativ zur Expression in altersgleichen Wildtyptieren untersucht. In den jungen *Cndp1*-Knockoutmäusen war die Expression von *Hspa1*, *Nos2*, *Nfe2l2* bzw. *Nrf2* und *Tnfa* signifikant erhöht (Tabelle 6). Die *Tgfβ*-Expression war zwischen *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypmäusen nicht verschieden. In der 55-Wochen-Altersgruppe wiederum war keines der untersuchten Gene in den *Cndp1*-Knockoutmäusen im Kontrast zu den Wildtyptieren höher exprimiert. *Nfe2l2* und *Tnfa* waren signifikant niedriger exprimiert. *Hspa1*-, *Nos2*-, und *Tgfβ*-Expression waren unverändert. In den 55 Wochen alten Tieren wurde zusätzlich noch die relative Expression von *Gcs* bestimmt, die in den *Cndp1*-Knockouttieren auf 46 % verglichen mit den Wildtypkontrollen reduziert war.

Tabelle 6: Genexpressionsanalyse im Nierengewebe 11 und 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (je n = 4) mittels qPCR. Die dargestellten Werte sind relativ zu den Expressionsdaten der altersgleichen Wildtypmäuse (je n = 4) angegeben. In Klammern finden sich die Spannen der relativen Expression. \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01.

Gen	11 Wochen alte <i>Cndp1</i> -KO	55 Wochen alte <i>Cndp1</i> -KO
<i>Hspa1</i>	6,64** (1-43,9)	0,49 (0,12-1,96)
<i>Nos2</i>	1,87* (0,33-10,77)	0,77 (0,33-1,78)
<i>Nfe2l2</i>	1,87** (0,36-9,82)	0,47** (0,21-1,06)
<i>Tgfβ</i>	1,22 (0,21-7,1)	0,62 (0,21-1,88)
<i>Tnfa</i>	2,63** (0,4-17,28)	0,6** (0,24-1,5)

#### 4.4.3. Proteinoxidation in der Niere

Bei der Detektion der Proteinoxidation per OxyBlot im Nierengewebe beider Altersgruppen wurde zwischen *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypkontrolltieren sowohl für 55 Wochen alte (Abbildung 30) als auch 11 Wochen alte Tiere (Daten nicht gezeigt) kein Unterschied gefunden.



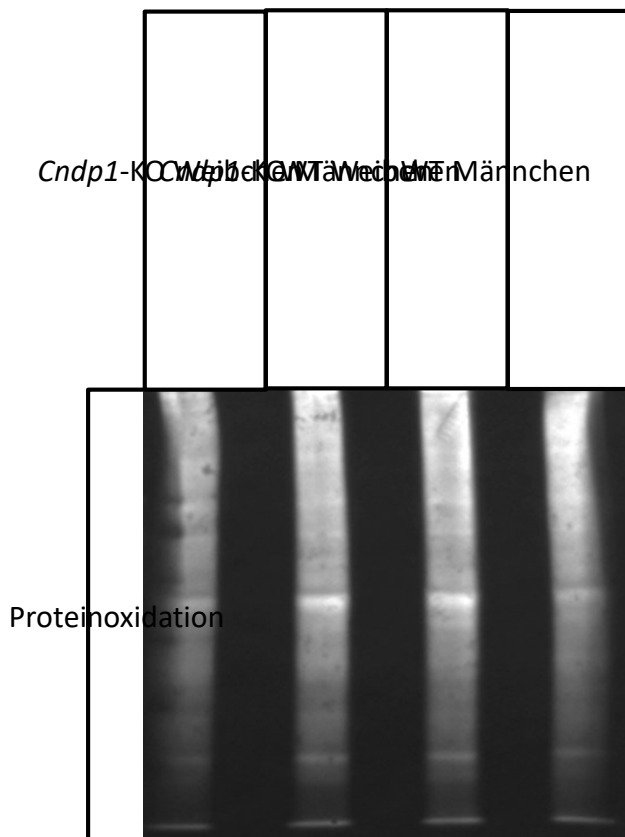


Abbildung 30: Proteinoxidation im Nierengewebe 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse und Wildtypmäuse. Ein repräsentativer Oxyblot wurde ausgewählt.

#### 4.5. Basaler Phänotyp der *Cndp1*-Knockoutmäuse

##### 4.5.1. Körpergewicht

Bei den 11 Wochen alten Tieren wurde kein Unterschied im Körpergewicht zwischen den *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypkontrollen festgestellt (Abbildung 31). Auch nach Auftrennung nach Geschlecht war weder bei den männlichen *Cndp1*-Knockouttieren im Vergleich zu den männlichen Wildtypkontrollen noch bei den weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen verglichen mit den weiblichen Wildtypmäusen ein signifikanter Unterschied feststellbar (Abbildung 32).

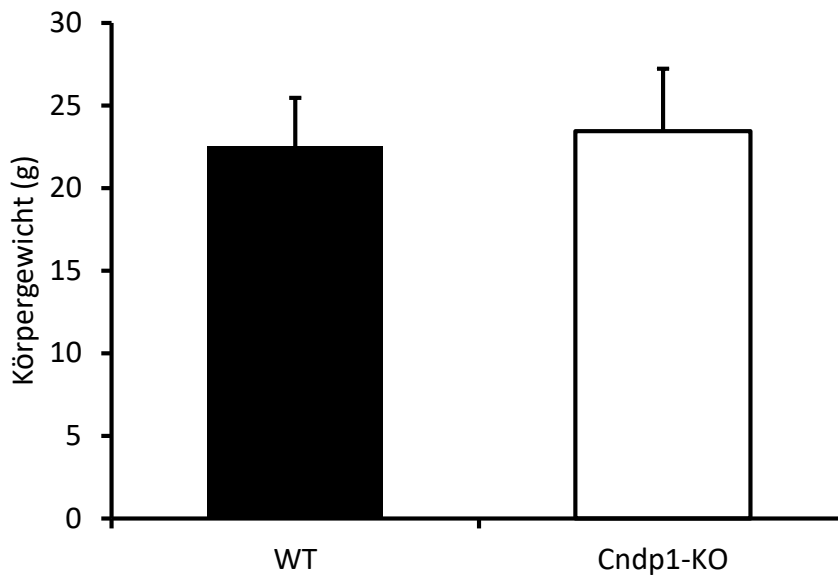


Abbildung 31: Körpergewichte 11 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 16) und Wildtypmäuse (n = 18). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

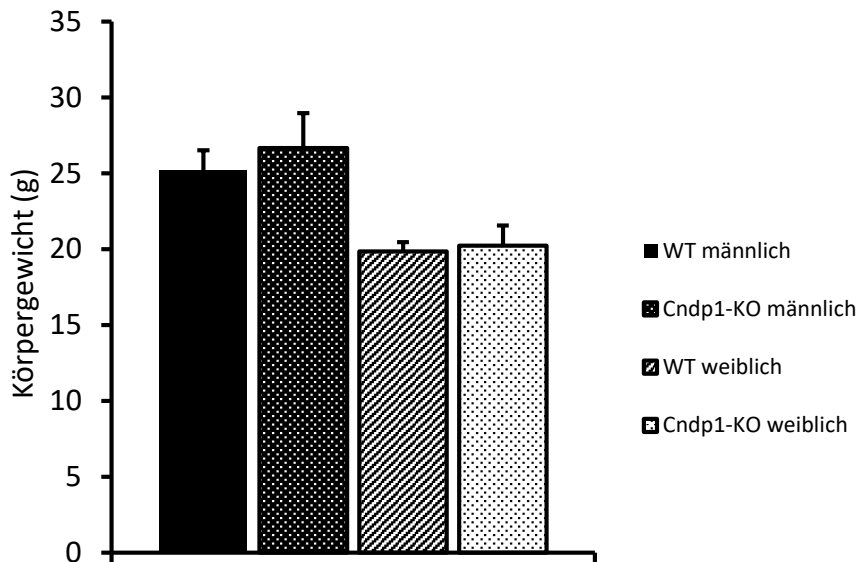


Abbildung 32: Körpergewichte 11 Wochen alter männlicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 8) und männlicher Wildtypmäuse (n = 9) sowie weiblicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 8) und weiblicher Wildtypmäuse (n = 9). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Bei den 55 Wochen alten Mäusen war das Körpergewicht der *Cndp1*-Knockouttiere um 18 % höher als das der entsprechenden Wildtypkontrollen (Abbildung 33). Sowohl die männlichen als auch die weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäuse wiesen gegenüber den männlichen bzw. weiblichen Wildtypmäusen einen signifikanten Anstieg des Körpergewichts um 13 % bzw. um 16 % auf (Abbildung 34).

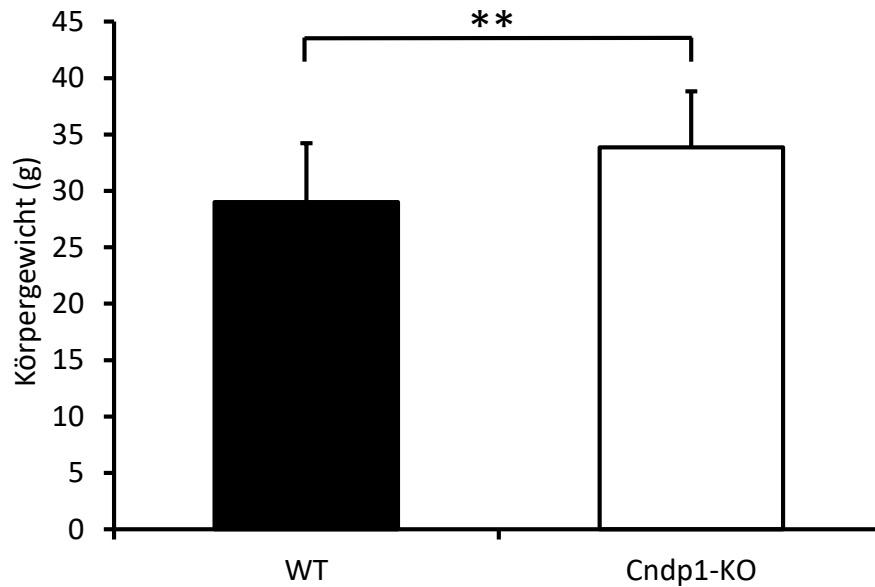


Abbildung 33: Körpergewichte 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 48) und Wildtypmäuse (n = 18). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01.

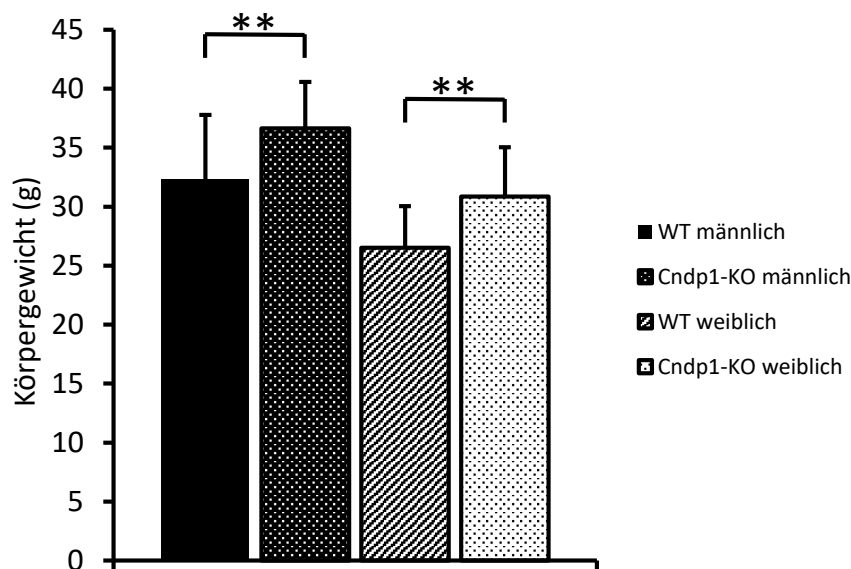


Abbildung 34: Körpergewichte 55 Wochen alter männlicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 26) und männlicher Wildtypmäuse (n = 9) sowie weiblicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 24) und weiblicher Wildtypmäuse (n = 12). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01.

#### 4.5.2. Organgewichte

In den 11 Wochen alten Tieren wurde keine signifikante Differenz bei den Gewichten der Organe festgestellt. Gehirn, Leber, Niere, Herz, Lunge und Milz waren relativ zum Körpergewicht (Abbildung 35), als auch absolut betrachtet (Abbildung 36) bei den *Cndp1*-Knockoutmäusen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen nicht verschieden. Bei gesonderter Auswertung nach Geschlecht zeigte sich in den männlichen *Cndp1*-

Knockoutmäusen eine signifikante Reduktion des Gehirn-zu-Körpergewicht-Quotienten im Vergleich zu den männlichen Wildtypkontrollen um 8 % (Abbildung 37). Die absoluten Gehirngewichte waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Bei den weiblichen Tieren konnten keine Unterschiede zwischen den *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypkontrollen festgestellt werden.

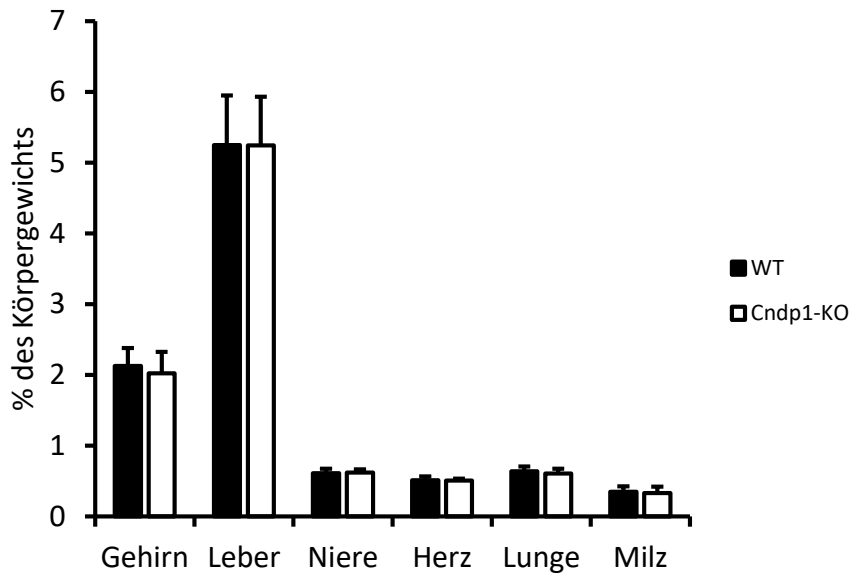


Abbildung 35: Relative Organgewichte im Vergleich zum Körpergewicht der 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 16) und Wildtypmäuse (n = 18). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

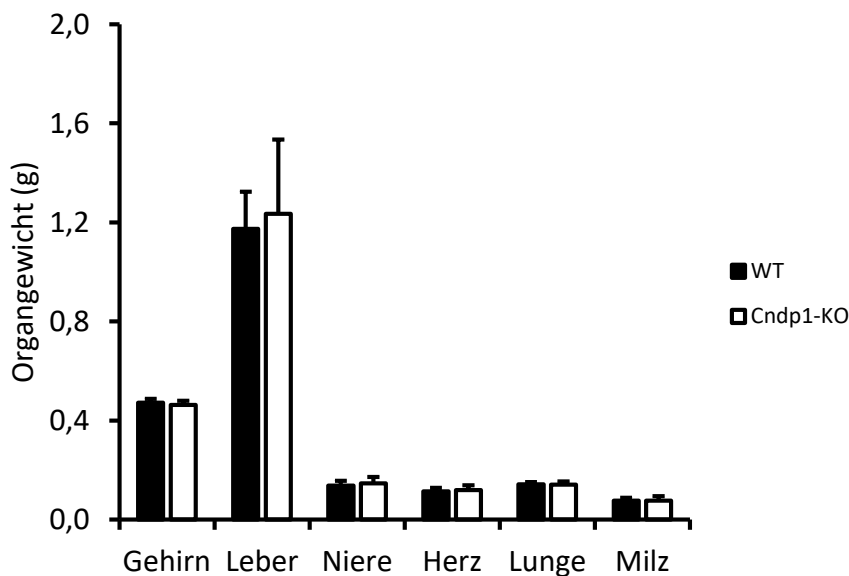


Abbildung 36: Organgewichte 11 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 16) und Wildtypmäuse (n = 18). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

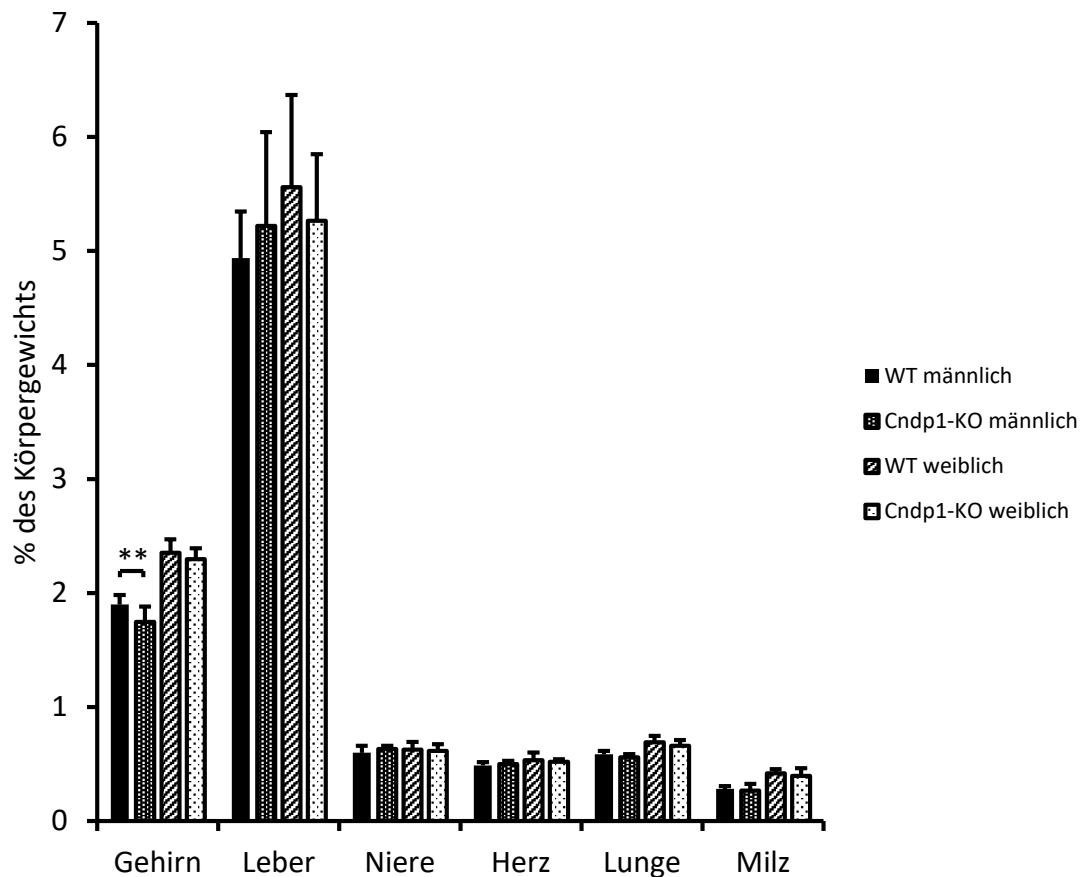


Abbildung 37: Relative Organgewichte im Vergleich zum Körpergewicht 11 Wochen alter männlicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 8) und männlicher Wildtypmäuse (n = 9) sowie weiblicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 8) und weiblicher Wildtypmäuse (n = 9). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01.

Bei den 55 Wochen alten Tieren konnte eine Verminderung des Organ-zu-Körpergewicht-Quotienten beim Gehirn um 12 % und bei den Lungen um 15 % sowie eine Zunahme bei der Milz um 32 % zwischen den *Cndp1*-Knockoutmäusen und den entsprechenden Wildtypkontrollen detektiert werden (Abbildung 38). Bei der Betrachtung der absoluten Organgewichte zeigte sich eine signifikante Erhöhung in allen Organen außer den Lungen, deren Gewicht unverändert war (Abbildung 39). Bei den männlichen *Cndp1*-Knockoutmäusen im Vergleich zu den männlichen Wildtypkontrollen war kein Unterschied im Verhältnis der Organe zum Körpergewicht nachweisbar. Bei den weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen war der Organ-zu-Körpergewicht-Quotient im Vergleich zu den weiblichen Wildtypkontrollen beim Gehirn um 10 % reduziert, bei der Milz dagegen um 31 % erhöht (Abbildung 40).

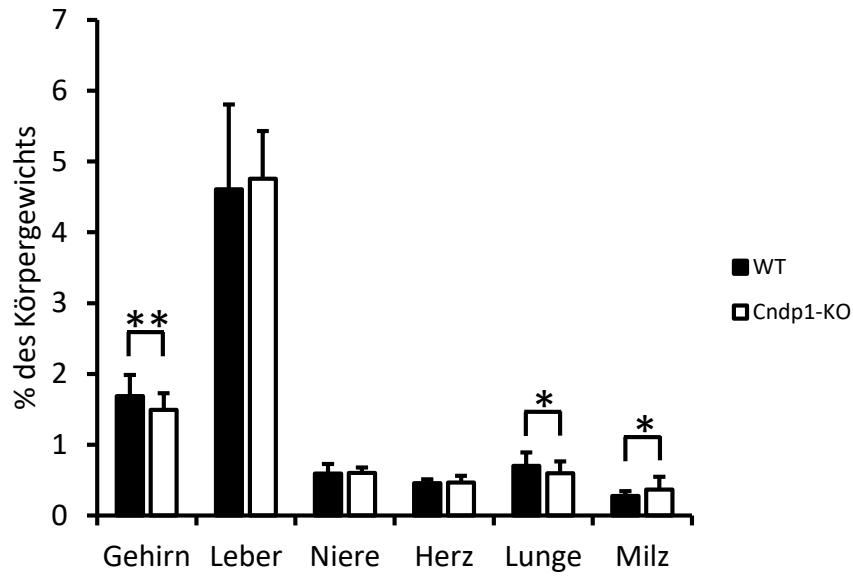


Abbildung 38: Relative Organweights im Vergleich zum Körpergewicht der 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 48) und Wildtypmäuse (n = 18). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01.

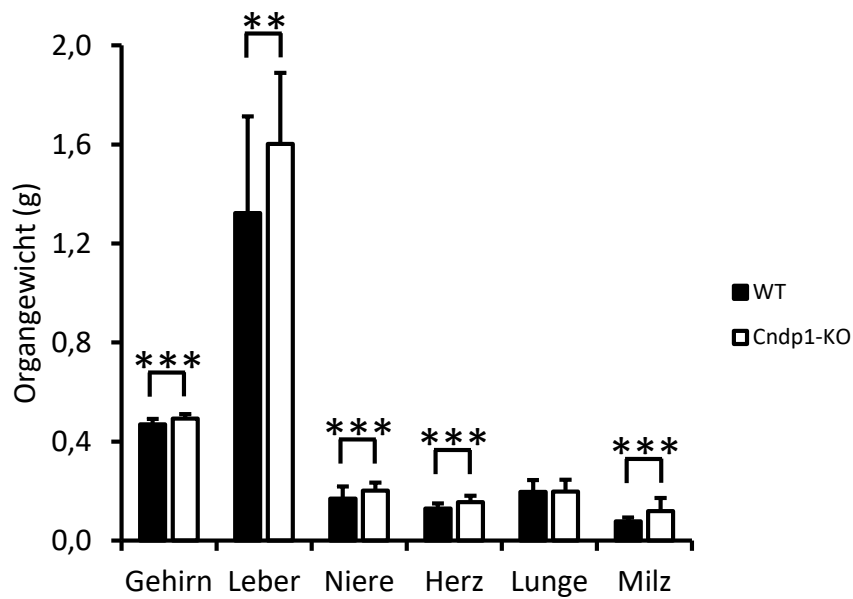


Abbildung 39: Organweights 55 Wochen alter *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 48) und Wildtypmäuse (n = 18). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001.

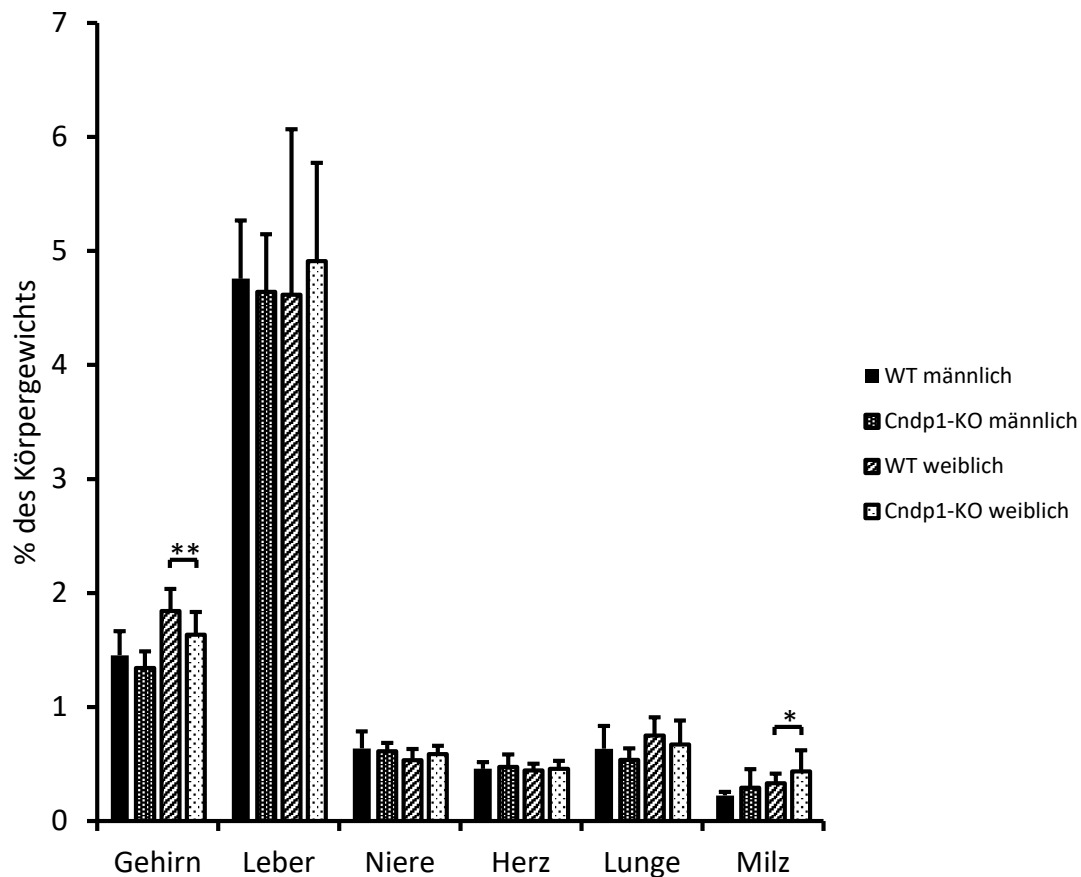


Abbildung 40: Relative Organgewichte im Vergleich zum Körpergewicht 55 Wochen alter männlicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 25) und männlicher Wildtypmäuse (n = 9) sowie weiblicher *Cndp1*-Knockoutmäuse (n = 24) und weiblicher Wildtypmäuse (n = 12). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. p < 0,05 \*\*; p < 0,01.

#### 4.5.3. Glukosehomöostase

Der Nüchternblutzuckerspiegel der 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäuse war im Vergleich zu den altersgleichen Wildtyptieren signifikant um 7 % erniedrigt (Abbildung 41). Für die weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäuse wurde kein Unterschied zu den weiblichen Wildtypkontrollen festgestellt (Abbildung 43 A), während bei den männlichen *Cndp1*-Knockoutmäusen ein um 10 % niedrigerer Nüchternblutzuckerspiegel nachweisbar war (Abbildung 43 B). Bei den 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen wurde ein um 10 % höherer Nüchternblutzuckerspiegel im Vergleich zu den Wildtypkontrollen gemessen (Abbildung 42). Der Nüchternblutzuckerspiegel der 55 Wochen alten weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäuse war 4 % höher als bei den weiblichen Wildtypkontrolltieren (Abbildung 43 C). Die Werte der 55 Wochen alten männlichen *Cndp1*-Knockoutmäuse unterschieden sich dagegen nicht von denen der gleichaltrigen männlichen Wildtyptiere (Abbildung 43 D).

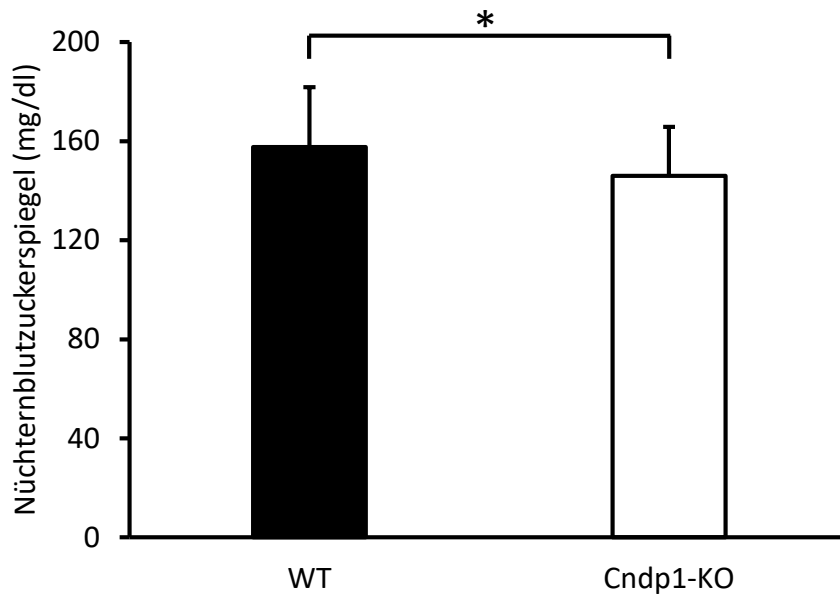


Abbildung 41: Nüchternblutzuckerspiegel bei 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen (n = 29) und Wildtypmäusen (n = 34). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*: p < 0,05.

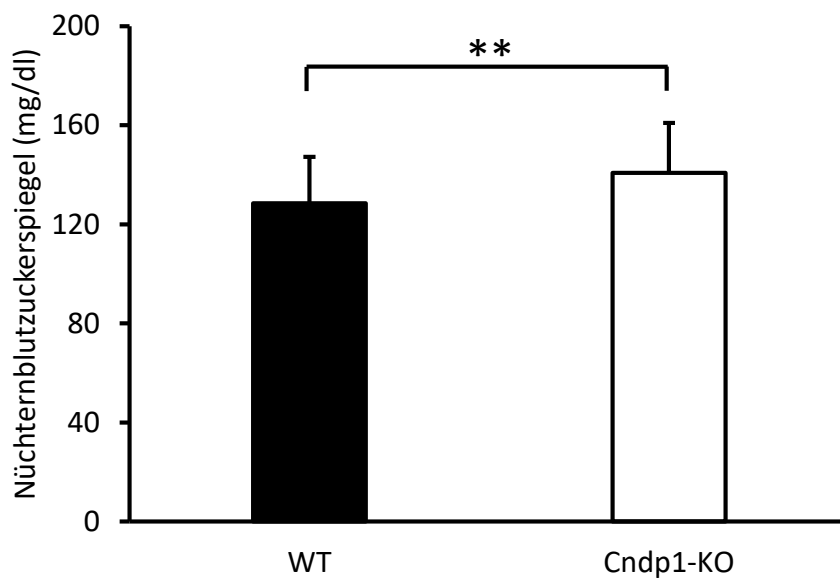
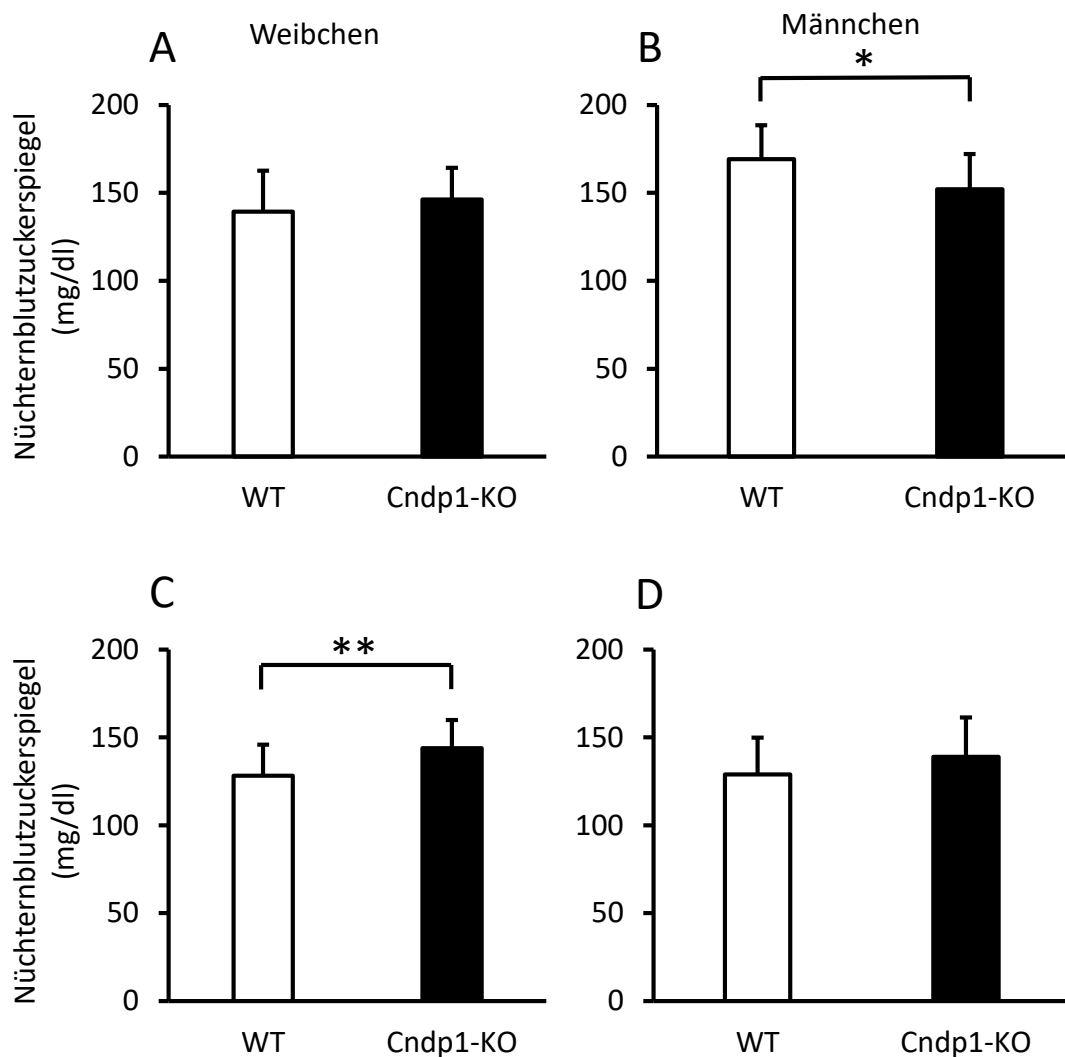


Abbildung 42: Nüchternblutzuckerspiegel bei 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen (n = 61) und Wildtypmäusen (n = 29). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. \*\*: p < 0,01.





Beim intraperitonealen Glukosetoleranztest wurde bei den 11 Wochen alten Tieren zu den Zeitpunkten 5 und 10 Minuten ein signifikanter Unterschied bei der Veränderung des Blutzuckerspiegels als Antwort auf die intraperitoneale Glukoseinjektion zwischen den Genotypen ermittelt (Abbildung 44 A). Der Genotyp war jedoch kein Prädiktor eines nichtlinearen Einflusses auf den Blutglukosespiegel, ebenso wenig das Geschlecht (Abbildung 45 A und B). Bei den 55 Wochen alten Mäusen konnte nur beim Messpunkt 5 Minuten nach der Glukoseinjektion ein Unterschied der relativen Blutzuckerwerte verzeichnet werden (Abbildung 44 B), während auch hier vergleichbar mit den jungen Tieren der Genotyp (Abbildung 44 B) und auch das Geschlecht (Abbildung 45 C und D) keinen signifikanten Unterschied bedingten.

Beim intraperitonealen Insulintoleranztest wurde bei den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen ausschließlich 80 Minuten nach der Insulinapplikation ein niedrigerer relativer Blutglukosewert im Vergleich zu den Wildtypkontrollen ermittelt (Abbildung 46 A). Zu allen anderen Messzeitpunkten war kein Unterschied nachweisbar. Bei den 55 Wochen alten Tieren wurden signifikant verschiedene Messwerte zwischen den Genotypen zu den Zeitpunkten 10, 15 und 60 Minuten ermittelt (Abbildung 46 B). In beiden Alterskohorten war der Genotyp der Mäuse kein Prädiktor einer signifikanten Differenz der Insulinsensitivität. Bei den 11 Wochen alten weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen zeigte sich im Vergleich zu den Wildtyptieren eine höhere Insulinsensitivität (Abbildung 47 A). Diese konnte bei den männlichen Tieren beider Altersgruppen und bei 55 Wochen alten weiblichen Mäusen nicht festgestellt werden (Abbildung 47 B, C und D).

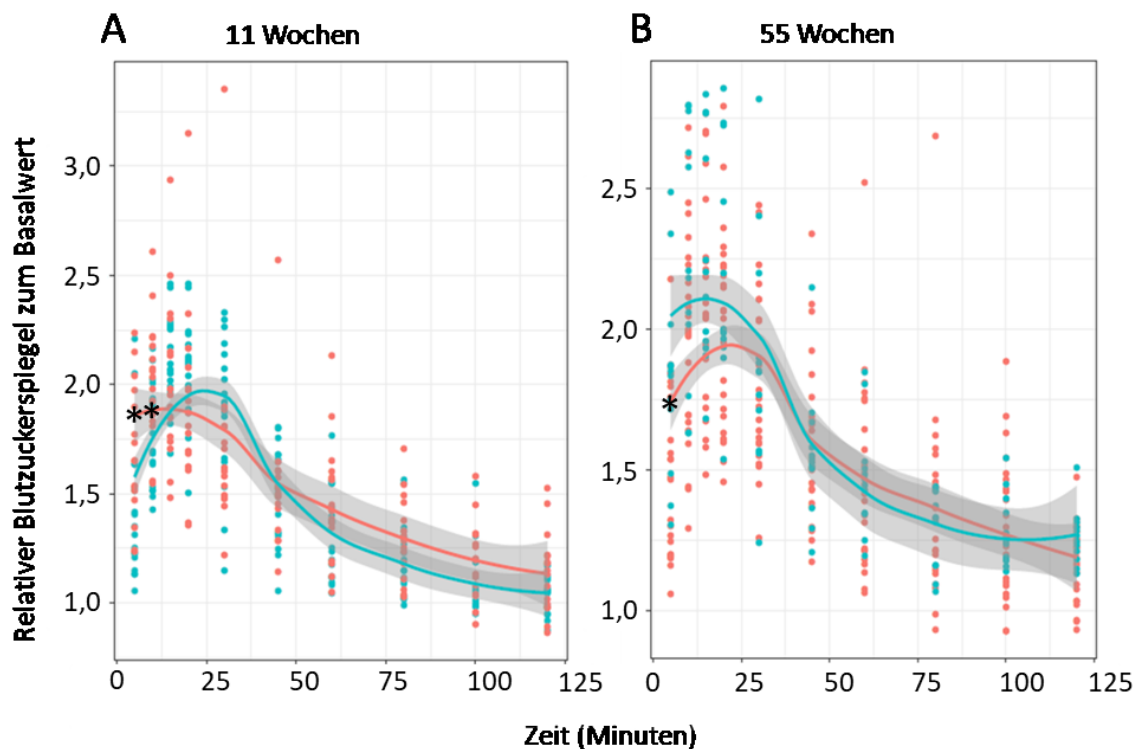


Abbildung 44: Intraperitonealer Glukosetoleranztest bei (A) 11 und (B) 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen (Rot; n = 16 und n = 25) im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypkontrollen (Blau; n = 18 und n = 12) mit Messung der Veränderung des Blutzuckerspiegels 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 100 und 120 Minuten nach der intraperitonealen Injektion von 2 g/kg Glukose. Die Werte sind relativ zum Blutzuckerwert zum Zeitpunkt 0 Minuten des jeweiligen Tieres angegeben. \*: signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen.

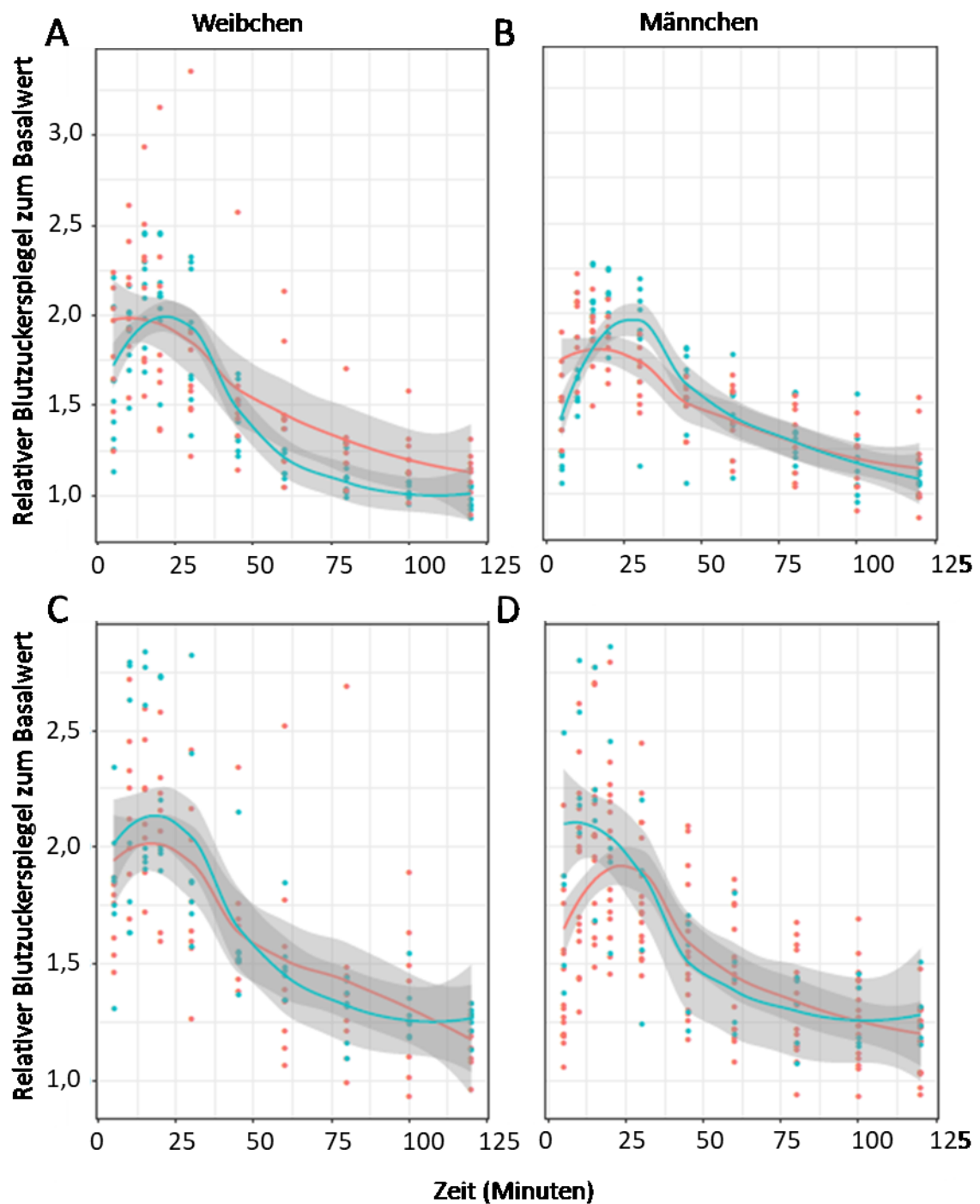


Abbildung 45: Intraperitonealer Glukosetoleranztest bei (A) weiblichen und (B) männlichen 11 Wochen alten und (C) weiblichen und (D) männlichen 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen (Rot; Weibchen: n = 8 und n = 8; Männchen: n = 8 und n = 17) im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypkontrollen (Blau; Weibchen: n = 9 und n = 7; Männchen: n = 9 und n = 5) mit Messung der Veränderung des Blutzuckerspiegels 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 100 und 120 Minuten nach der intraperitonealen Injektion von 2 g/kg Glukose. Die Werte sind relativ zum Blutzuckerwert zum Zeitpunkt 0 Minuten des jeweiligen Tieres angegeben.

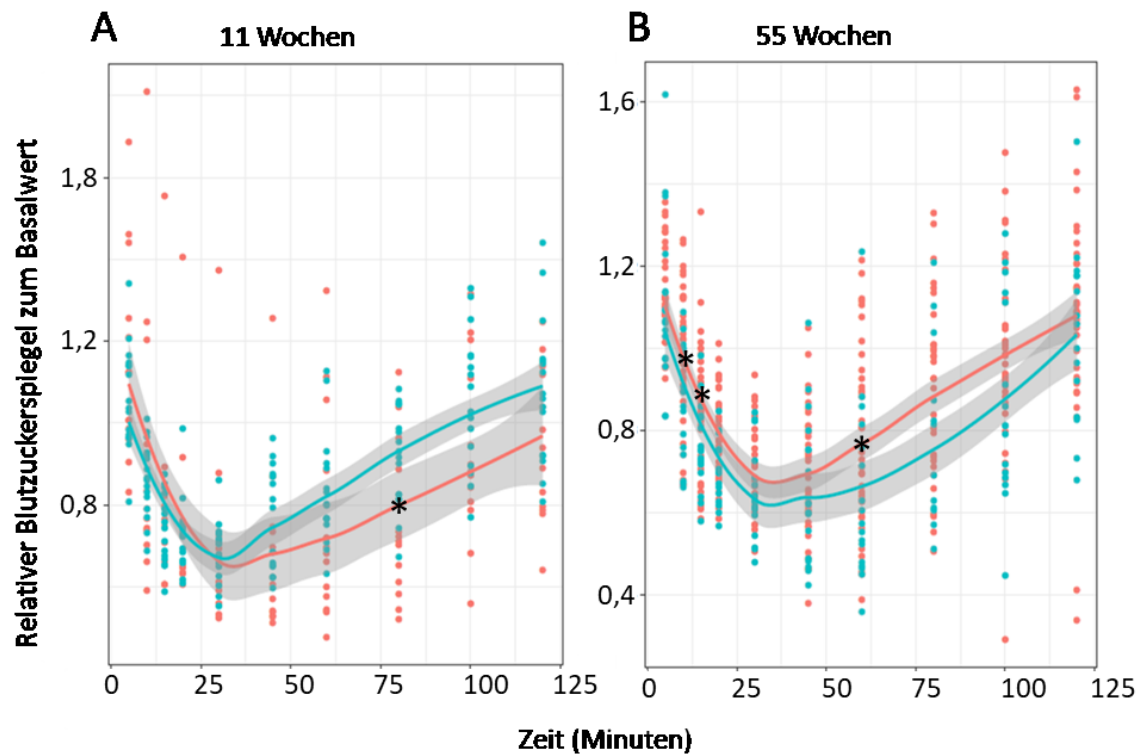


Abbildung 46: Intraperitonealer Insulintoleranztest bei (A) 11 und (B) 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen (Rot; n = 13 und n = 36) im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypkontrollen (Blau; n = 16 und n = 17) mit Messung der Veränderung des Blutzuckers 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 100 und 120 Minuten nach der intraperitonealen Injektion von 1 U/kg Insulin. Die Werte sind relativ zum Blutzuckerwert zum Zeitpunkt 0 Minuten des jeweiligen Tieres angegeben. \*: signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen.

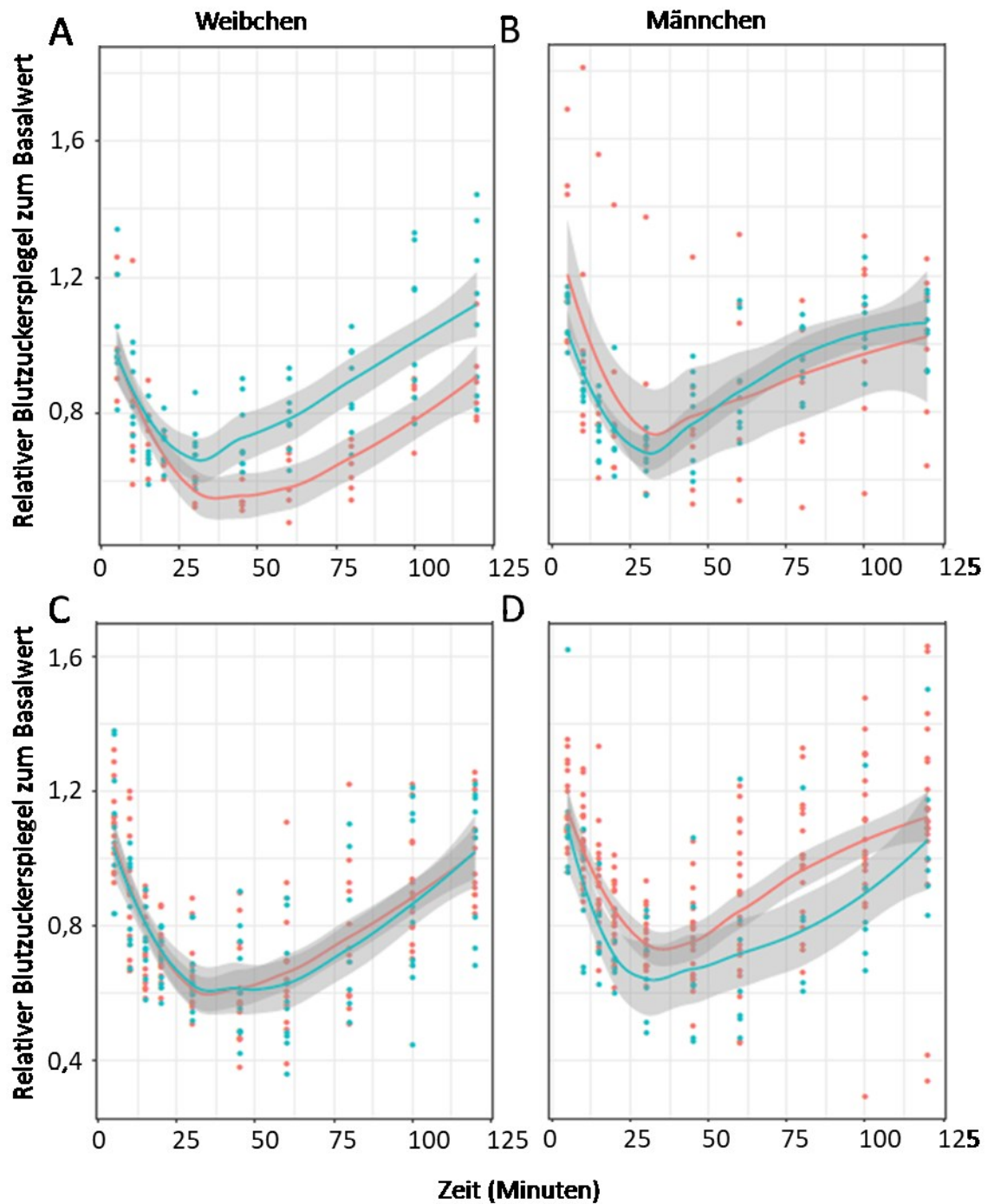


Abbildung 47: Intraperitonealer Insulintoleranztest bei (A) weiblichen und (B) männlichen 11 Wochen alten und (C) weiblichen und (D) männlichen 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen (Rot; Weibchen: n = 6 und n = 10; Männchen: n = 7 und n = 21) im Vergleich zu den altersgleichen Wildtypkontrollen (Blau; Weibchen: n = 8 und n = 15; Männchen: n = 8 und n = 7) mit Messung der Veränderung des Blutzuckerspiegels 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 100 und 120 Minuten nach der intraperitonealen Injektion von 1 U/kg Insulin. Die Werte sind relativ zum Blutzuckerwert zum Zeitpunkt 0 Minuten des jeweiligen Tieres angegeben.

## 5. Diskussion

Der homozygote Knockout des Carnosinase 1-Gens führte im Vergleich zu Mäusen mit zwei Wildtyp-Allelen zu stark erhöhten Konzentrationen von Carnosin und Anserin in der Niere mit unterschiedlichen Ausprägungen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht der Tiere. Die geringe Carnosinase-Restaktivität war auf eine unspezifische Aktivität der Carnosinase 2 zurückzuführen, die *ex vivo* lediglich unter supraphysiologischen Substratkonzentrationen detektierbar war. Carnosinase-Aktivität in den Wildtypkontrollen konnte ausschließlich im Nierengewebe festgestellt werden. In Gehirn, Leber, Muskel, Lunge, Herz, Serum und Pankreas fand kein Carnosinabbau statt. Es handelt sich somit bei den *Cndp1*-Knockoutmäusen mit einer *de facto* nierenspezifischen Carnosinase 1-Defizienz und lokal stark gesteigerter Carnosin- und Anserinkonzentration um ein ideales Modell zum Studium der funktionellen Bedeutung des renalen Carnosinmetabolismus für den murinen Stoffwechsel im Allgemeinen und speziell für die Carnosin und Anserin abhängigen protektiven Mechanismen gegen chronische Nierenerkrankungen wie die diabetische Nephropathie (DN).

### 5.1. Die renale Carnosinase-Aktivität ist in den *Cndp1*-Knockoutmäusen *de facto* ausgeschaltet

Nur in der Niere konnte in den Wildtyptieren ein Carnosinabbau gemessen werden. Bereits frühere Studien des Carnosinmetabolismus in Nagern konnten eine relevante Carnosinase-Aktivität ausschließlich im Nierengewebe nachweisen [177, 178]. Im Gegensatz hierzu findet sich beim Menschen eine hohe Carnosinase 1-Aktivität vor allem im Serum sowie dem Gehirn [179], wobei es auch eine messbare renale Enzymaktivität gibt [14]. Im Vergleich zu Nagern erschwert diese hohe Serum-Carnosinase 1-Aktivität beim Menschen eine orale Supplementation von Carnosin und Anserin, da diese nach der Aufnahme ins Blut einem raschen Abbau unterliegen [13]. Trotz der unterschiedlichen Lokalisierung der Enzymaktivität beim Menschen und bei der Maus, nahm die Carnosinase 1-Aktivität wie beim Menschen [89, 180] auch in den Mäusen mit dem Alter zu. Eine Geschlechtsspezifität der Enzymaktivität wie sie für die humane Serum-Carnosinase 1 beschrieben wurde [88], konnte bei den Mäusen in der Niere jedoch nicht beobachtet werden.

In den *Cndp1*-Knockoutmäusen war die renale Carnosinase 1-Aktivität im Vergleich zu den Wildtypkontrollen stark reduziert. Dieser Effekt war alters- und geschlechtsunabhängig. In den *Cndp1*-Knockoutmäusen beider Altersgruppen schien eine Restaktivität von etwa 20 % im Vergleich mit den gleichaltrigen Wildtypmäusen vorhanden zu sein. Diese konnte durch Bestatin, einem Inhibitor der Carnosinase 2 [181], vollständig unterdrückt werden. Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene [182] wurde in renalen Zellen eine solche Enzymaktivität nachgewiesen. Dabei wurde diese Isoform als unspezifische cytosolische Carnosinase beschrieben [182, 183], die nur im basischen Milieu mit einem pH-Wert von 9,5 Carnosin abbaut [184]. Da außerdem alle Experimente zum Carnosinabbau mit supraphysiologisch hohen Substratkonzentrationen durchgeführt wurden, spiegelt dies nicht den Carnosinabbau im renalen Gewebe bzw. den Beitrag der Carnosinase 2 *in vivo* wider. Es ist somit wahrscheinlicher, dass der renale Carnosinabbau in den Wildtypmäusen *in vivo* auf der Aktivität der Carnosinase 1 fußt, die in den *Cndp1*-Knockoutmäusen praktisch ausgeschaltet ist.

## **5.2. Die renalen Konzentrationen von Carnosin und Anserin sind in den *Cndp1*-Knockoutmäusen erhöht**

Dieser Verlust der Carnosinase 1-Aktivität führte sowohl in 11 als auch 55 Wochen alten Mäusen zu einer stark erhöhten Konzentration der Carnosinase-Substrate Carnosin und Anserin ausschließlich im Nierengewebe. Diese gewebsspezifische Erhöhung der Carnosin- und Anserinspiegel konnte mittels MALDI-MSI bestätigt und dem Cortex der Niere zugeordnet werden. Es besteht somit ein direkter Zusammenhang zwischen der stark verminderten Carnosinase-Aktivität und der gesteigerten Konzentration dieser histidinhaltigen Dipeptide in den Nieren der *Cndp1*-Knockoutmäuse. Dies entspricht aufgrund der hohen Spezifität der Carnosinase 1 für Carnosin und in etwas geringerem Maße für Anserin [78] den Erwartungen. In Humanstudien konnte ein solcher Zusammenhang bisher nur partiell bestätigt werden. So zeigten Peters et al. [185], dass in gesunden Probanden die Carnosinase-Aktivität im Serum und die Konzentration von Carnosin und Anserin selbst bei einer Reduktion der Aktivität auf 10 % des Normwertes nicht korrelieren. Auch im Mausmodell war nicht immer ein konstanter Nachweis möglich. So war in den 55 Wochen alten, männlichen Wildtypmäusen trotz fast verdoppelter Enzymaktivität im Vergleich zu den 11 Wochen alten Wildtypmäusen die

renale Carnosinkonzentration unverändert. Im Nierengewebe der 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäuse waren sowohl Carnosin als auch Anserin im Vergleich zu den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen reduziert, obwohl keine Zunahme des Carnosinabbaus mit dem Alter detektierbar war. Hieraus lässt sich folgern, dass die renale Histidindipeptid-Konzentration einerseits von der Carnosinase 1-Aktivität in den Nieren abhängig ist, jedoch nicht ausschließlich durch diese reguliert wird. Weitere Mechanismen müssen altersabhängig zu einer Regulation des Carnosinabbaus beitragen. Die Synthese von Carnosin erfolgt aus  $\beta$ -Alanin und L-Histidin durch die Carnosinsynthase [57], die ebenfalls aus  $\beta$ -Alanin und Methyl-L-histidin Anserin bilden kann. Eine Expression der Carnosinsynthase im Nierengewebe konnte bereits nachgewiesen werden [14, 60], allerdings ist dieses Enzym im Vergleich zur Carnosinase 1 weniger detailliert charakterisiert. Eine Reduktion der Expression bzw. Aktivität der Carnosinsynthase mit zunehmendem Alter könnte ebenfalls zur Verminderung der Carnosin- und Anserinkonzentration beitragen.

Neben der veränderten Synthese sind auch weitere altersbedingte Veränderungen als Ursache der erniedrigten renalen Carnosin- und Anserinspiegel denkbar. So werden 55 Wochen alte Mäuse bereits als alte Tiere mit Seneszenzerscheinungen eingestuft [166]. Dagegen gelten 11 Wochen alte Mäuse als gerade der Adoleszenz entwachsene Tiere. Aufgrund der Verknüpfung des Alterungsprozesses mit der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies [186] und *advanced glycation endproducts* [187], kann für die 55 Wochen alten Tieren ein verstärkter oxidativer Stress in den Nieren angenommen werden. Carnosin und Anserin gelten als Fänger verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies und AGEs, mit denen sie stabile Intermediate bilden [40, 74, 188]. Folglich ist als weitere Ursache der reduzierten Konzentrationen von Carnosin und Anserin bei den alten Mäusen der erhöhte Verbrauch durch verstärkte Inaktivierung der vorgenannten reaktiven Metabolite möglich.

Während die renale Carnosinase-Aktivität für männliche und weibliche *Cndp1*-Knockouttiere beider Altersgruppen nicht verschieden war, konnten geschlechtsabhängige Unterschiede für die renale Carnosin- und Anserinkonzentration beobachtet werden. Der Anstieg der renalen Carnosinkonzentration im Vergleich zu den alters- und geschlechtsentsprechenden Wildtypmäusen war bei den weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen weit ausgeprägter als bei den männlichen Tieren. Im Gegensatz zu den



Carnosinspiegeln war der Konzentrationsanstieg für Anserin zwischen *Cndp1*-Knockoutmäusen und den entsprechenden Wildtypkontrollen beiderlei Geschlechts nicht verschieden.

Als Ursache für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der renalen Carnosinkonzentrationen konnte neben der Carnosinase-Aktivität auch eine unterschiedliche Aufnahme von Carnosin ausgeschlossen werden. Im Futter der Mäuse war weder Carnosin noch Anserin vorhanden, d.h. es erfolgte keine akzidentelle exogene Supplementation mit den Histidindipeptiden. Da die geschlechtsspezifischen renalen Konzentrationsunterschiede insofern nicht durch Aufnahme oder Abbau bedingt sind, könnte dies auf entsprechende Unterschiede in der Carnosin-Synthese hinweisen, die möglicherweise alters- und/oder geschlechtsspezifisch reguliert ist. Sollte dies der Fall sein, bleibt die Frage, warum diese Unterschiede sich nur in der Carnosinkonzentration, nicht jedoch in der Anserinkonzentration widerspiegeln. Denkbar ist, dass die Synthese von Anserin nicht oder nur zu geringen Teilen über die Carnosinsynthese verläuft. So konnte bereits das Enzym Histamin N-Methyltransferase-like (HNMT-like) im Muskelgewebe von Hühnern [73] und ein Ortholog in Ratte und Mensch sowie in der Hefe [75] als Carnosin-N-Methyltransferase, die Anserin durch Methylierung von Carnosin synthetisiert, nachgewiesen werden. Auch in der Maus konnte eine ubiquitäre Expression des kodierenden Gens gezeigt werden [189]. Dieses Enzym, respektive das Gen, könnte im Gegensatz zur Carnosinsynthese geschlechtsunabhängig aktiv oder exprimiert sein, sodass die renale Anserinkonzentration in männlichen und weiblichen Mäusen eines Genotyps und Alters nicht signifikant unterschiedlich ausfällt.

### **5.3. Die Carnosin- und Anserinkonzentration in anderen Organen der *Cndp1*-Knockoutmäuse sind kaum verändert**

Die höchsten Konzentrationen von Carnosin und Anserin konnten unabhängig von Geschlecht und Genotyp mit großem Abstand stets im Muskel gemessen werden. Kamal et al. [18] zeigten bereits, dass nur im *Bulbus olfactorius*, der hier nicht getrennt vom Rest des Gehirns in die Messung einfluss, noch höhere Werte in murinem Gewebe ermittelt werden können. Die Zusammensetzung der Histidindipeptide ist für verschiedene Taxa sehr spezifisch [190] und die verschiedenen Gewebe sind zusätzlich

durch unterschiedliche Verhältnisse dieser Histidindipeptide zueinander gekennzeichnet, wie bereits durch Jackson und Lenney [191] für Ratten und den Menschen bestimmt wurde. So wiesen in den *Cndp1*-Knockout- und Wildtypmäusen beispielsweise Muskel- und Nierengewebe Carnosin und Anserin in einem äquimolaren Verhältnis auf. Im Gehirn wiederum waren die Carnosin- und Anserinkonzentrationen insgesamt geringer, Carnosin aber wesentlich stärker konzentriert als Anserin. Dies könnte auf die unterschiedlichen organspezifischen Limitationen der für die Synthese der Histidindipeptide notwendigen Substrate zurückzuführen sein, aber auch auf verschiedene Stressfaktoren, denen die Gewebe ausgesetzt sind, bzw. durch die unterschiedlichen Anforderungen an Schutzmechanismen, die daraus resultieren, bedingt sein. Während für Carnosin, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, das Abfangen von reaktiven Metaboliten wie Dialdehyden oder  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Aldehyden [192, 193] sowie eine effektivere Verhinderung der Bildung von AGEs [164, 169] beschrieben sind, so besitzt Anserin ein höheres anti-oxidatives Potenzial und [194] und führt zu einer gesteigerter Expression von *HSPA1* in humanen Tubulusepithelzellen.

Außerhalb der Niere sind die Carnosin- und Anserinkonzentrationen anderer Gewebe nur gering durch die *Cndp1*-Defizienz beeinflusst, doch wurden signifikante Unterschiede in Leber, Muskel und Herz gemessen. Diese Differenzen zwischen den Genotypen existieren, obwohl in den untersuchten Organen weder in den Wildtyptieren, noch den *Cndp1*-Knockoutmäusen Carnosinase-Aktivität detektiert wurde. Es ist demnach eine renale Ursache anzunehmen. Aus diesem Grund wurden die Konzentrationen von Carnosin und Anserin im Serum untersucht. In 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war die Anserinkonzentration im Kontrast zu den gleichaltrigen Wildtyptieren erhöht, die Carnosinkonzentration jedoch unverändert. Die Konzentrationsunterschiede von Carnosin und Anserin in den nicht-renalen Organen waren nur in den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen signifikant verschieden. In den 55 Wochen alten Mäusen findet also möglicherweise eine Sezernierung von Anserin aus dem Nierengewebe ins Blut statt, sodass sich die Serumkonzentration erhöht, doch beeinflusst dies die Konzentration in anderen Geweben nicht. Ein Re-Import in andere Organe findet mutmaßlich nicht statt.

Bisher wurde von einem vergleichbaren Transport von Carnosin und Anserin ausgegangen. Für die Aufnahme in Gewebe sind Mitglieder der Protonen gekoppelten

Oligopeptid-Transporter-Familie (PEPT1, PEPT2, PHT1, PHT2) sowohl für Carnosin [195, 196], als auch Anserin [197] beschrieben. Die Expression von PHT1 konnte in Podozyten, Mesangial- und Tubulusepithelzellen, die Expression von PEPT1, PEPT2 und PHT2 nur in Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden. Der Transport aus dem Gewebe ins Blut ist weniger gut charakterisiert. Jappar et al. [198] postulierten für die Niere einen vielfach höheren Transport vom Tubuluslumen in die Epithelzelle als der Efflux über die basolaterale Membran in Richtung Interstitium/Blut. Insofern wird eher von einer Akkumulation in der Niere ausgegangen. Der Transport ins Blut basiert wahrscheinlich auf einer erleichterten Diffusion mithilfe von Carrier-Proteinen, deren Zusammenspiel mit den apikalen Protonen gekoppelten Transportern bereits für andere Zelltypen beschrieben wurde [199]. Während es demnach plausibel erscheint, dass die Carnosinkonzentration im Serum der *Cndp1*-Knockoutmäuse nicht signifikant verändert war, so ist unklar warum Anserin in weit höheren Mengen sezerniert wurde. Die chemischen Eigenschaften von Carnosin und Anserin wurden als sehr ähnlich beschrieben [200], dennoch ist durch die zusätzliche Methylgruppe des Anserinmoleküls und die damit einhergehende Veränderung der sterischen Eigenschaften sowie der Ladungsverteilung [201] ein höherer Transport aus den Nierenzellen denkbar.

Während also in den 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen fast ausschließlich ein Export von Anserin aus der Niere ins Blut stattfand, der Carnosin-Efflux vernachlässigbar war, und sich dies nicht auf die Histidindipeptid-Spiegel anderer Gewebe auswirkte, konnte für die 11 Wochen alten Mäuse nicht genug Blut entnommen werden. Es liegen folglich keine Serumwerte für Carnosin und Anserin vor und der tatsächliche Export aus dem Nierengewebe bleibt zu untersuchen. In diesen Tieren war jedoch auffällig, dass im Muskelgewebe der *Cndp1*-Knockoutmäuse verglichen mit den Wildtypkontrollen keine Erhöhung, sondern eine Reduktion der Carnosin- und Anserinkonzentration gemessen wurde. Aufgrund der mit dem Alter abnehmenden Syntheserate waren die renalen Carnosin- und Anserinkonzentrationen in den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen möglicherweise noch höher als in den 55 Wochen alten Tieren. Diese hohen Konzentrationen wirkten sich jedoch nicht auf die Serumkonzentration von  $\beta$ -Alanin, den limitierende Faktor der Carnosin-Synthese [202], aus. Auch im Muskelgewebe selbst war in den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen die  $\beta$ -Alanin-Konzentration im Vergleich zu den Wildtypkontrollen nicht verändert. Somit kann ausgeschlossen werden,

dass die stark erhöhte Histidindipeptid-Synthese in der Niere über den gesteigerten Bedarf an Substraten die  $\beta$ -Alanin-Konzentration im Serum nachhaltig beeinflusste und in der Folge zu einer Substrat-Depletion im Muskelgewebe geführt hat. Da auch im Muskel wie in allen anderen Organen außer der Niere keine nennenswerte Carnosinase-Aktivität gemessen wurde, sind andere renale Effekte als Ursache wahrscheinlich.

#### **5.4. Die Funktionalität und Morphologie der Niere ist in *Cndp1*-Knockoutmäusen unverändert**

In den *Cndp1*-Knockoutmäusen wurde trotz Veränderungen des renalen Carnosinmetabolismus kein Unterschied in der Morphologie und Funktionalität der Niere im Vergleich zu den Wildtyptieren festgestellt. Vor dem Hintergrund, dass in Studien mit Supplementation von Carnosin [137] und Anserin [194] in Nagern diabetische Spätschäden wie die diabetische Nephropathie partiell verhindert werden, erschien es sinnvoll zu überprüfen, ob die Akkumulation dieser Histidindipeptide und die Reduktion der renalen Carnosinase-Aktivität auch im gesunden Tier, also unabhängig von einem Schutz vor den Folgen der diabetischen Stoffwechsellage, Auswirkungen auf die durch die diabetische Nephropathie veränderten Nierenfunktionsparameter sowie Morphologie hat. Die diabetische Nephropathie geht oftmals einher mit einer initialen Hyperfiltration, die sich in einem Anstieg der glomerulären Filtrationsrate niederschlägt [203] und möglicherweise zur Manifestation der nachfolgenden Mikroalbuminurie beiträgt [204, 205]. Morphologisch geht dem eine Verdickung der glomerulären und tubulären Basalmembran und eine mesangiale Expansion voraus [206]. Diese diffuse oder noduläre Sklerosierung treibt zusammen mit Läsionen der Podozyten die Progression der diabetischen Nephropathie, in deren Verlauf es dann zu einem Abfall der Filtrationsleistung kommt [207].

In der detaillierten mikroskopischen Begutachtung der histochemisch angefärbten Gewebeschnitte waren keine pathologischen Veränderungen in den mit der diabetischen Nephropathie assoziierten Parametern in den Nieren der Mäuse feststellbar. Zusätzlich zeigten Gewebeschnitte, die mit PAS angefärbt wurden, in der *in silico*-Auswertung für 55 Wochen alte *Cndp1*-Knockoutmäuse und die entsprechenden Wildtypkontrollen keinen Unterschied in der absoluten Deposition angefärbten Materials in den Glomeruli. In *in vitro*-Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass

Carnosin und Anserin gegenüber den drei untersuchten renalen Zelltypen (murine Mesangialzellen und Podozyten, sowie humane Tubulusepithelzellen), obwohl sie unterschiedliche Konzentrationen dieser Histidindipeptide tolerierten, insgesamt nur eine geringe Toxizität ausübten und die  $EC_{50}$  weit unter den Konzentrationen lag, die in den Nieren der *Cndp1*-Knockoutmäusen erreicht wurden. Auch die Nierenfunktion (GFR) war bei beiden Genotypen nicht verschieden und weder pathologisch erhöht noch erniedrigt, sondern im normalen Bereich [208, 209]. Zusätzlich lassen diese Ergebnisse auch auf das Ausbleiben eines negativen Einflusses der *Cndp1*-Defizienz auf das Auftreten Seneszenz bedingter Läsionen der Niere schließen, die sich durch eine Glomerulosklerose und infolgedessen eine Reduktion der GFR äußern würden [210, 211], und die weder in den *Cndp1*-Knockoutmäusen noch in den Wildtyptieren bis zum Alter von 55 Wochen beobachtet wurde.

Einzig auffällig war der Albumin-zu-Creatinin-Quotient (ACR) im Spontanurin der Tiere. Ein Verhältnis von 30 bis 300 mg Albumin/g Creatinin wird als Mikroalbuminurie definiert [212]. Zwar waren die Werte für beide Genotypen nicht signifikant verschieden, lagen aber mit im Mittel 74 mg/g und 96 mg/g in diesem pathologischen Bereich. Gegen eine tatsächliche Albuminurie spricht, dass eine Mikroalbuminurie zumeist mit einer reduzierter GFR einhergeht [213], die definitiv nicht vorlag. Zwar kann eine Mikroalbuminurie auch unabhängig von einem GFR-Abfall auftreten, zum Beispiel durch mikrovaskuläre Schäden [214] oder Veränderungen im tubulären Transport ohne Beeinträchtigung der Filtration in frühen Stadien des Diabetes mellitus [215], doch erscheint dies als Ursache für gesunde Mäuse eher unwahrscheinlich. Selbst für die Messung beim Menschen existieren viele verschiedene Richtlinien zur Bestimmung der ACR [216] zum Beispiel mit unterschiedlichen Zeitpunkten der Urinsammlung und Analysemethoden, die zur Variabilität der Resultate beitragen. Zusätzlich nimmt die Creatinin-Sekretion mit dem Alter ab [97], was das Verhältnis von Albumin zu Creatinin bei den 55 Wochen alten Tiere zusätzlich erhöht haben könnte. Die erhöhten Messwerte als Folge der angewandten Messmethode bzw. den zugrunde gelegten Kriterien ist also eher anzunehmen als eine pathologische Veränderung in den Nieren.

Die Konzentrationen der proteinogenen Aminosäuren im Nierengewebe waren nur partiell und nicht in beiden Altersgruppen gleichermaßen verändert. In den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen waren Asparagin, Glutamin und Serin und in den 55

Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen Arginin im Vergleich zu den altersentsprechenden Wildtypkontrollen reduziert. Ferner fällt auf, dass trotz der erhöhten Carnosin- und Anserinspiegel in den Nieren die Konzentration des Substrates L-Histidin in den *Cndp1*-Knockoutmäusen nicht verändert war. Da in der Maus keine *de novo*-Synthese von L-Histidin erfolgt [217], ist die verringerte Abundanz von Asparagin, Glutamin und Serin bzw. Arginin nicht auf das Aufrechterhalten der L-Histidin-Konzentration im Zuge eines gesteigerten Verbrauchs für die Carnosin- und Anserinsynthese zurückzuführen. Analog waren die  $\beta$ -Alanin-Konzentrationen, die in Muskel, Niere und Serum von 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen gemessen wurden, nicht verändert.  $\beta$ -Alanin wird bei Säugetieren hauptsächlich über die Degradation von Uracil in der Leber generiert und nicht aus seiner  $\alpha$ -Form wie andere  $\beta$ -Aminosäuren [218] bzw. durch Decarboxylierung von Asparaginsäure wie in Prokaryoten [219]. Daher waren die reduzierten Aminosäurekonzentrationen wahrscheinlich auch nicht an  $\beta$ -Alanin gekoppelt.

In den jungen als auch alten *Cndp1*-Knockoutmäusen waren Carnosin- und Anserinkonzentration in den Nieren erhöht und insofern gleichsinnige Effekte in beiden Altersgruppen zu erwarten. Da dies aber nicht der Fall war, sorgen vermutlich zusätzliche Parameter wie das Alter dieser Tiere dafür, dass die Aminosäurekonzentrationen im Nierengewebe unterschiedlich verändert waren. Zwar war die Morphologie und Funktionalität des renalen Gewebes selbst durch diese Veränderungen nicht beeinträchtigt, doch spielt die Niere eine substantielle Rolle in der Synthese und dem Austausch von Aminosäuren zwischen den Organen [220]. So findet als Kompensation des Verlusts von Creatinin über den Urin in hohem Maße Arginin-Synthese statt [221], und auch Serin wird zu großen Teilen, beim Fasten möglicherweise ausschließlich, in der Niere synthetisiert und nachfolgend sezerniert [222]. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die Effekte der *Cndp1*-Defizienz auf den renalen Aminosäuremetabolismus in anderen Organen schwerwiegender sind als in der Niere selbst.

### **5.5. Indikatoren für Schutzmechanismen vor Carbonyl- und oxidativem Stress sind in den Nieren der *Cndp1*-Knockoutmäuse verändert**

Neben der Nierenfunktion und renalen Morphologie wurde auch der Einfluss des homozygoten *Cndp1*-Knockouts auf weitere Parameter im Nierengewebe bestimmt, insbesondere solche, die entweder für Carnosin oder Anserin als Schutzmechanismen gegen diabetische Komplikationen postuliert wurden oder als solche aufgrund der Ursachen bzw. Progression der diabetischen Nephropathie wahrscheinlich erscheinen. Hierzu gehört die Proteinoxidation durch eine direkte Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen [223], die bei diabetischer Stoffwechsellage vermehrt infolge einer mitochondrialen Dysfunktion entstehen [224, 225], oder andere Sauerstoffradikale, die durch vermindertes Abfangen als Folge eines Anstiegs des *thioredoxin interacting protein* [226], reduzierte GSH-Spiegel oder eine erniedrigte SOD-Aktivität akkumulieren [227]. Auch unter nicht-diabetischen Bedingungen, bzw. im gesunden Tier, findet stets eine basale ROS-Produktion statt, die leicht über der Aktivität der anti-oxidativen Systeme liegt, sodass kontinuierlich oxidative Modifikationen auftreten [228]. Daher wurde auch in den *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtyptieren Proteinoxidation festgestellt. Diese war bei den 11 bzw. 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen im Vergleich zu den altersgleichen Wildtyptieren nicht verschieden. Trotz dem durch Carnosin vermittelten, postulierten Schutz gegenüber oxidativem Stress [229, 230] z.B. durch Erhöhung der SOD-Aktivität [151], direkte Inaktivierung von ROS [40, 74] oder eine erhöhte *Hspa1*-Expression durch Anserin [194], was zu einer Verminderung der renalen Proteinoxidation führen sollte, kam es in den *Cndp1*-Knockoutmäusen nicht dazu. Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass Carnosin, anders als von Aydin et al. [149] publiziert, in diesem Tiermodell keinen positiven Einfluss auf die GSH-Konzentration der Niere hat. So wurden in 55 Wochen alten Tieren beider Genotypen keine Unterschiede in der renalen GSH- oder GSSG-Konzentration detektiert. Eine erhöhte GSH-Konzentration würde aufgrund der Wirkung von Glutathion als Antioxidans [231] eine verringerte Konzentration oxidierter Proteine bedingen. Ebenfalls gestützt wird dies durch die semi-quantitative MALDI-MSI-Analyse, die einerseits auch kein Indiz auf Konzentrationsunterschiede zwischen *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtyptieren gab und darüber hinaus sowohl GSH als auch GSSG im Nierenmark lokalisierte. Diese räumliche Distanz zur Carnosin- und Anserinlokalisierung im Nierencortex ist möglicherweise die Ursache für den fehlenden

Einfluss der hohen Carnosinkonzentration in den *Cndp1*-Knockoutmäusen auf das GSH-GSSG-Verhältnis.

Die Carbonylierung von Proteinen findet nicht nur über direkte Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies statt [232], sondern auch über eine Glykierung mithilfe reaktiver Aldehyde wie Methylglyoxal [233], deren Konzentrationen ebenso im Diabetes mellitus stark erhöht sind [234]. Methylglyoxal kann dabei auch über oxidativen Stress durch z.B. Lipidperoxidation gebildet werden [235]. Im Nierengewebe der *Cndp1*-Knockoutmäuse war die Proteinoxidation im Vergleich zum den entsprechenden Wildtypkontrollen nicht verschieden, trotz der deutlich erhöhten Carnosin- und Anserinkonzentration. Ebenso war auch in den humanen Tubulusepithelzellen *in vitro* die Bildung von Hydroimidazon 1 (MG-H1), einem Methylglyoxaladdukt, bei Co-Inkubation mit Carnosin und Anserin nicht unterschiedlich zu den nur mit Methylglyoxal behandelten Kontrollen. MG-H1 repräsentiert dabei als Hauptaddukt der Reaktion von Methylglyoxal mit Proteinen einen prominenten Vertreter der Proteinglykierung [236]. Analysen in zellfreier Umgebung über NMR konnten durchaus eine direkte Interaktion von Carnosin und Anserin mit Methylglyoxal nachweisen, die zur Bildung von Methylglyoxal-Oligomeren und -Polymeren führte. Diese sind möglicherweise weniger reaktiv als Methylglyoxal, was einen potenziellen Mechanismus darstellen könnte wie die Carbonylierung von Proteinen durch Carnosin und Anserin verhindert werden kann. Aus den Proteincarbonylen können durch komplexe mehrstufige Reaktionen AGEs entstehen [237]. Versuchsansätze mit humanem Albumin als Beispiel modifizierbarer Proteine zeigten wiederum, dass sowohl bei der Bildung von AGEs allgemein als auch speziell dem AGE N<sup>ε</sup>-(Carboxyethyl)-lysin (CEL) hohe Quotienten von Carnosin und/oder Anserin zu Methylglyoxal nötig sind um deren Konzentration zu reduzieren. Dies kann erklären warum keine MG-H1-Reduktion in den Versuchen mit humanen Tubulusepithelzellen möglich war, da nur Carnosin-zu-Methylglyoxal-Quotienten von maximal 2:1 eingesetzt wurden. In der gesunden *Cndp1*-Knockoutmaus wiederum können im Nierengewebe Quotienten von Carnosin zu Methylglyoxal erreicht werden, die eine AGE-Reduktion ermöglichen würden. Thornalley [238] konnte bei Ratten eine Methylglyoxal-Konzentration von etwa 1 nmol/g Nierengewebe nachweisen. Unter Annahme von ca. 16 % Proteingehalt der Niere [239] und ähnlichen Werten für Mäuse ergibt dies eine Methylglyoxal-Konzentration von 0,00016 nmol/mg Protein. Bei



Carnosinkonzentrationen zwischen 1 und 2 nmol/mg Protein bei den *Cndp1*-Knockoutmäusen resultiert ein Quotient von Carnosin zu Methylglyoxal von 6250 : 1 bis 12500 : 1. Da somit die Konzentration von AGEs, respektive den Proteincarbonyl-Intermediaten, prinzipiell signifikant vermindert werden könnte, dies jedoch in den *Cndp1*-Knockoutmäusen nicht detektiert werden konnte, deutet dies darauf hin, dass die Bildung von Proteincarbonylen in der Niere im gesunden Tier durch Methylglyoxal nur in vernachlässigbar kleinen Mengen erfolgt bzw. ein direktes Abfangen von Methylglyoxal durch Carnosin *in vivo* nicht stattfindet.

Die Expressionsanalyse im Nierengewebe zeigte in den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen einen Anstieg der Expression von *Tnfa* und *Nfe2l2* im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Das vom *Tnfa*-Gen kodierte TNFA ist ein Zytokin mit einer tragenden Rolle bei der akuten und bei der chronischen Inflammation [240, 241]. *Nfe2l2* ist das kodierende Gen für den Transkriptionsfaktor NRF2, der im Wesentlichen die Expression von anti-oxidativ wirkenden Enzymen wie z.B. Hämoxygenase-1 (HO-1) steuert [242]. TNFA selbst kann jedoch über die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies zur Aktivierung von NRF2 führen [243]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das *Silencing* der TNFA induzierten NRF2-Stressantwort pro-inflammatorische Zytokine stimuliert [244]. Aus diesem Grund treibt möglicherweise die gesteigerte Expression von *Tnfa* und *Nfe2l2* in den *Cndp1*-Knockoutmäusen die von NRF2 kontrollierte Expression zytoprotektiver Gene wie *NAD(P)H dehydrogenase (quinone) 1 (Nqo1)* und *Ho-1* an [245] und stellt somit einen Schutzmechanismus gegen die mit dem Diabetes mellitus assoziierte Entzündung dar, der zu der beobachteten Verhinderung diabetischer Spätschäden durch Carnosin und Anserin beiträgt, die in diabetischen Mausmodellen beschrieben wurde. Gestützt wird diese Überlegung durch eine erhöhte Expression des Gens der induzierbaren Stickstoffmonoxid (NO) -Synthase (NOS2) im Nierengewebe der *Cndp1*-Knockoutmäuse. Für NOS2 wurde gezeigt, dass sie NO für die S-Nitrosylierung des NRF2-KEAP1-Komplexes produziert, was das Abfangen von NRF2 durch KEAP1 verhindert und somit dessen Translokation in den Zellkern verstärkt [246]. Des Weiteren stützen diese Expressionsanalysen auch die in humanen proximalen Tubulusepithelzellen gefundene Korrelation einer gesteigerten *HSPA1*-Expression bei Supplementation von Anserin unter oxidativem Stress. Sowohl die Anserinkonzentration als auch der TNFA mediierte oxidative Stress sowie die Expression des Gens des

Hitzeschockproteins 70 sind in den Nieren der 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäuse im Vergleich zu den Wildtypkontrollen erhöht.

Zwar wurde kürzlich von Oppermann et al. [247] eine transkriptionsmodulierende Wirkung von Carnosin über eine verstärkte Histon-Acetylierung nachgewiesen, doch könnten wie im Falle der MAPK [248] bzw. KRAS [249] auch indirekte Effekte von Carnosin z.B. durch die Verminderung von reaktiven Sauerstoffspezies für diese Veränderungen in der Genexpression verantwortlich sein. So ist denkbar, dass die erhöhten renalen Carnosin- und Anserinkonzentrationen in den *Cndp1*-Knockoutmäusen tatsächlich einen protektiven Effekt gegen oxidativen Stress bedingen wie in verschiedenen Studien gezeigt [250, 251]. Gleichzeitig ist aber auch bekannt, dass eine gewisse basale Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies essentiell ist, da verschiedene Signalwege darüber gesteuert werden, wie z.B. redox-sensitive Cysteine, welche die Aktivität verschiedener Proteinkinasen kontrollieren [252, 253]. So ist beispielsweise die Phosphorylierung des Insulinrezeptors im Zuge der Insulinbindung abhängig von der Produktion dieser reaktiven Sauerstoffspezies und in transgenen Mäusen, welche die Wasserstoffperoxid detoxifizierende Glutathionperoxidase-1 [254] überexprimieren, gestört [255]. Vielleicht greift hier also ein regulativer Mechanismus, der im Rahmen der Verringerung der ROS-Spiegel durch die stark erhöhten Carnosin- und Anserinkonzentrationen in den Nieren in *Cndp1*-Knockoutmäusen die Bildung von TNFA und damit von reaktiven Sauerstoffspezies erhöht, um die Aufrechterhaltung dieser Signalkaskaden zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu den jungen Tieren waren in den alten *Cndp1*-Knockoutmäusen die Expression von *Tnfa* und *Nfe2l2* herunterreguliert. Mit dem Alterungsprozess konnte eine Zunahme pro-inflammatorischer Zytokine, darunter auch TNFA, gezeigt werden [256, 257]. So ist auch für die Wildtypkontrolltiere eine Erhöhung der Expression zwischen 11 und 55 Wochen anzunehmen. Da stets nur ein relativer Vergleich der *Cndp1*-Knockoutmäuse zu den altersgleichen Wildtypkontrollen über qPCR und keine absolute Quantifizierung der Transkripte erfolgte, besteht die Möglichkeit, dass in den *Cndp1*-Knockoutmäusen sich absolut betrachtet die Expression zwischen 11 und 55 Wochen kaum ändert, statt tatsächlich vermindert zu sein. Die Expression des *Nfe2l2*-Gens erfährt ebenfalls eine gewebsspezifische Veränderung mit zunehmendem Alter [258]. George et al. [259] zeigten hierbei für Nierengewebe jedoch keine Modulation

auf. In diesem Fall ist also nicht nur die relative, sondern auch die absolute mRNA-Menge in den 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen verringert. Warum jedoch mit zunehmendem Alter scheinbar eine gegenläufige Regulation dieser Gene erfolgt, ob nun durch die vorbeschriebene epigenetische Wirkung von Carnosin bzw. Anserin oder indirekt durch das Abfangen reaktiver Metabolite, bleibt unklar. In den 55 Wochen alten Tieren wurde zusätzlich noch die Expression des kodierenden Gens der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (GCS), auch als Glutamat-Cystein-Ligase bezeichnet, bestimmt, die in *Cndp1*-Knockoutmäusen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen reduziert war. Dieses Enzym synthetisiert aus Glutamat und Cystein  $\gamma$ -Glutamylcystein und stellt den ersten und geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Glutathion-Synthese dar [260]. Eine verringerte Expression erscheint im Kontext der reduzierten Expression von *Nfe2l2* plausibel, da über NRF2 eine positive Regulation der Expression der Gene der *Glutamate cysteine ligase catalytic subunit* (GCLC) [261] und *Glutamate cysteine ligase modifier subunit* (GCMC) [262] des Enzyms stattfindet. Dies zeigte im Nierengewebe allerdings keine Auswirkung auf die Konzentrationen von  $\gamma$ -Glutamylcystein, GSH oder des Substrats Cystein.

#### **5.6. Das Körper- und die Organgewichte der *Cndp1*-Knockoutmäuse sind erhöht**

Das Körpergewicht der 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäuse war im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkontrollmäusen erhöht. Bao et al. [263] haben gezeigt, dass Schweine, die mit Carnosin über die Nahrung supplementiert wurden, eine erhöhte Gewichtszunahme mit gesteigerter Futteraufnahme, jedoch keine Veränderung der Muskelgröße aufweisen. Ebenso zeigten Gewebeschnitten der Skelettmuskulatur der *Cndp1*-Knockoutmäuse keine Anzeichen für eine Hypertrophie der Muskelfasern als Ursache der Gewichtszunahme. Gegen eine Gewichtszunahme, die nur auf Fetteinlagerung basiert, spricht wiederum, dass in Experimenten mit Ratten eine intravenöse Carnosinapplikation in niedrigen Dosen die Lipolyse sogar förderte und in hohen Konzentrationen ohne Effekt blieb, die Fettdeposition aber nicht begünstigte [145]. Ebenso war in Zebrafischen mit einem Carnosinase 1-Knockout unter Hochfett-Diät die Gewichtszunahme gehemmt [264]. Auch in den *Cndp1*-Knockoutmäusen wiesen Gewebeschnitte der Niere, des Muskels und speziell der Leber, bei der Fettleibigkeit einhergeht mit unterschiedlichen Ausprägungen der nicht-alkoholischen

Fettlebererkrankung (NAFLD) wie etwa einer Steatose [265], keine Anzeichen für solche pathologischen Veränderungen auf. In Humanstudien konnte ein erhöhter BMI jedoch auch mit höheren Organgewichten korreliert werden [266]. Zusätzlich waren auch alle Organgewichte mit Ausnahme der Lungen in den *Cndp1*-Knockoutmäusen erhöht, sodass eine Analyse der Futterraufnahme und des Energieumsatzes dieser Mäuse in zukünftigen Experimenten sinnvoll erscheint, ebenso wie eine Analyse der Wachstumshormone im Blut, um so zu bestimmen, über welche Mechanismen die erhöhten renalen Carnosin- und Anserinkonzentrationen das Körper- bzw. die Organgewichte beeinflussen.

### **5.7. Die Glukosehomöostase in den *Cndp1*-Knockoutmäusen ist verändert**

Die Glukosehomöostase war in den *Cndp1*-Knockoutmäusen altersabhängig im Vergleich zu den Wildtypkontrollen signifikant verändert. Dabei lagen die Nüchternblutzuckerspiegel der beiden Genotypen grundsätzlich im Bereich publizierter Werte für C57BL/6-Mäuse [267] mit den zu erwartenden Schwankungen durch die Verwendung eines Glukometers mit Eichung auf Humanblut [268]. In den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen war der Nüchternblutzuckerspiegel erniedrigt und in den 55 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen jeweils im Vergleich mit den altersentsprechenden Kontrolltieren erhöht. Zusätzlich waren die Effekte geschlechtsspezifisch und der Nüchternblutzuckerspiegel korrelierte nicht mit der Insulinsensitivität. Bei reduzierter Insulinsensitivität durch gestörte Glukoseabsorption, hauptsächlich in Skelettmuskel und Herz, konnte ein höherer Blutzuckerspiegel gezeigt werden [269]. In den 11 Wochen alten weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen war trotz erhöhter Insulinsensitivität keine Reduktion des Blutzuckerspiegels gegenüber weiblichen Wildtypmäusen nachweisbar. In den männlichen 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen mit unveränderter Insulinsensitivität war der Nüchternblutzuckerspiegel dagegen erniedrigt. Bei den 55 Wochen alten Tieren war der Nüchternblutzuckerspiegel in weiblichen *Cndp1*-Knockoutmäusen erhöht, obwohl die Insulinsensitivität unverändert war. In den männlichen *Cndp1*-Knockoutmäusen war der Nüchternblutzucker trotz reduzierter Insulinsensitivität nicht verschieden im Vergleich mit den entsprechenden Wildtypkontrollen.

Dies kann darauf hindeuten, dass diese Unterschiede weniger auf die Insulinsensitivität als auf die ausgeschüttete Insulinmenge zurückzuführen sind. So kann etwa beim Typ 2-Diabetes eine anfängliche Kompensation der verminderten Insulinsensitivität durch eine Hyperinsulinämie erfolgen [270]. Hierfür spricht auch, dass in Mäusen mit Streptozotocin induziertem Diabetes durch Supplementation mit Carnosin die Expression des Insulin-Gens normalisiert werden kann [19]. In diesen Tieren wurde weder eine vermehrte Carnosinase 1- bzw. Carnosinsynthase-Expression, noch ein Anstieg der Carnosinkonzentration bei Carnosinfütterung im Pankreasgewebe detektiert. Auch in den *Cndp1*-Knockoutmäusen und den zugehörigen Wildtypkontrollen wurde keine pankreatische Carnosinase 1-Aktivität gefunden. Somit erfolgt die Beeinflussung des Blutzuckerspiegels bei *Cndp1*-Defizienz wahrscheinlich nicht über die Carnosinase-Aktivität im Pankreas bzw. eine Akkumulation von Carnosin, sondern über andere Mechanismen oder indirekt über die Nieren.

Die Nieren beeinflussen die Glukosehomöostase auf drei Wegen: 1. Die Freisetzung von Glukose durch renale Glukoneogenese. 2. Die Aufnahme aus der Zirkulation zur Deckung des Energiebedarfs. Und 3. die Resorption über die glomeruläre Filtration [271]. Bis zu 25 % der systemischen Glukoneogenese erfolgen nicht über die Leber, sondern über die Nieren [272]. Glutamin stellt dabei das wichtigste Substrat dar [273]. Da in den 11 Wochen alten *Cndp1*-Knockoutmäusen ein Abfall in der Konzentration dieser Aminosäure ermittelt wurde, könnte der erniedrigte Nüchternblutzuckerspiegel dieser Tiere zusätzlich durch die reduzierte Glutamin-Konzentration bedingt sein.

## **5.8. Limitationen und Ausblick**

Die Charakterisierung des *Cndp1*-Knockoutmausmodells bildet die ideale Ausgangslage zur Feststellung der Bedeutung des Carnosinmetabolismus in der Niere und zur Differenzierung zwischen dessen lokalen renalen Effekten und dem Einfluss auf die Glukosehomöostase für diabetische Spätkomplikationen, speziell die diabetische Nephropathie. Die Experimente und Messungen müssen dabei stets im Kontext dieser Studie als Vorarbeit zu einem diabetischen Modell betrachtet werden. Es handelt sich also folglich um eine Beschreibung des Grundzustands der nicht-diabetischen *Cndp1*-Knockoutmäuse und die Veränderungen durch die stark erhöhten Carnosin- und Anserinkonzentrationen im Nierengewebe im Vergleich zu den Wildtypkontrollen.

Protektive Effekte der *Cndp1*-Defizienz können losgelöst von der diabetischen Stoffwechsellage weniger gut charakterisiert werden. Im gesunden Tier, d.h. unter Bedingungen, die keinen zusätzlichen Stress auf den Organismus ausüben, existieren bereits gut adaptierte Schutzmechanismen, wie z.B. die Superoxiddismutase oder Glutathionperoxidase, die das grundsätzlich vorhandene Niveau reaktiver Metabolite größtenteils kompensieren können. Der schützende Einfluss von Carnosin wurde dagegen eher in extremen Stoffwechsellagen gezeigt, wenn andere protektive Mechanismen bereits ausgelastet oder inhibiert sind. So konnten erwartungsgemäß in Hinblick auf die Morphologie und Funktionalität der Nieren in den Wildtyptieren keine krankhaften Veränderungen festgestellt werden. Ein schützender Effekt durch die erhöhten renalen Carnosin- und Anserinkonzentrationen bei einer *Cndp1*-Defizienz tritt somit nicht auf, da schon die Kontrollgruppe keine pathologischen Charakteristika aufweist. Entsprechendes gilt auch z.B. für die Proteinoxidation im Nierengewebe. Zusätzlich kann durch diese Messungen ausgeschlossen werden, dass die vollständige *Cndp1*-Defizienz, anders als die bloße orale Supplementation von Carnosin oder Anserin in vielen Tierstudien, selbst negative Auswirkungen besitzt. Verschiedene Signalwege wie etwa der Insulinsignalweg werden unter anderem über reaktiven Sauerstoff gesteuert. Ein effektives Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies durch sehr hohe Carnosin- oder Anserinspiegel könnte also prinzipiell auch einen negativen Einfluss haben.

Den logischen nächsten Schritt muss somit das Herbeiführen einer diabetischen Stoffwechsellage in *Cndp1*-Knockoutmäusen und Wildtypkontrollen darstellen um diabetische Komplikationen und speziell, wenn auch im Rahmen der begrenzten Vergleichbarkeit zwischen der Maus und dem Menschen, eine diabetische Nephropathie zu erzeugen. Durch diese Schädigungen und die Aus- und Überlastung der renalen und systemischen Schutzmechanismen wird dann bewertet werden können, ob und wie eine *Cndp1*-Defizienz mit gesteigerten renalen Carnosin- und Anserinkonzentrationen einen protektiven Effekt ausübt.

## 6. Literatur

1. Quinn, P.J., A.A. Boldyrev, and V.E. Formazuyk, *Carnosine: Its properties, functions and potential therapeutic applications*. Molecular Aspects of Medicine, 1992. **13**(5): p. 379-444.
2. Boldyrev, A.A. and S.E. Severin, *The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: Distribution, properties and biological significance*. Advances in Enzyme Regulation, 1990. **30**: p. 175-188.
3. Wada, N., et al., *Behavioral and omics analyses study on potential involvement of dipeptide balenine through supplementation in diet of senescence-accelerated mouse prone 8*. Genomics Data, 2016. **10**: p. 38-50.
4. Song, B.C., et al., *Biological functions of histidine-dipeptides and metabolic syndrome*. Nutr Res Pract, 2014. **8**(1): p. 3-10.
5. Bauer, K., *Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain*. Neurochem Res, 2005. **30**(10): p. 1339-45.
6. Boldyrev, A.A., G. Aldini, and W. Derave, *Physiology and pathophysiology of carnosine*. Physiol Rev, 2013. **93**(4): p. 1803-45.
7. Gulewitsch, W.L. and S. Amiradzibi, *Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes*. Ber Deutsch Chem Ges, 1900.
8. Davey, C.L., *The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1960. **89**(2): p. 303-308.
9. Blancquaert, L., et al., *Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by beta-alanine transamination*. J Physiol, 2016. **594**(17): p. 4849-63.
10. Stegen, S., et al., *Muscle histidine-containing dipeptides are elevated by glucose intolerance in both rodents and men*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121062.
11. Carnegie, P.R., K.P. Hee, and A.W. Bell, *Ophidine (beta-alanyl-L-3-methylhistidine, "balenine") and other histidine dipeptides in pig muscles and tinned hams*. J Sci Food Agric, 1982. **33**(8): p. 795-801.
12. Clifford, W.M., *The Distribution of Carnosine in the Animal Kingdom*. Biochem J, 1921. **15**(6): p. 725-35.
13. Mendelson, S.D., *10 - NUTRITIONAL SUPPLEMENTS AND METABOLIC SYNDROME*, in *Metabolic Syndrome and Psychiatric Illness*, S.D. Mendelson, Editor. 2008, Academic Press: San Diego. p. 141-186.
14. Peters, V., et al., *Intrinsic carnosine metabolism in the human kidney*. Amino Acids, 2015. **47**(12): p. 2541-50.
15. Peters, V., et al., *Carnosine treatment largely prevents alterations of renal carnosine metabolism in diabetic mice*. Amino Acids, 2012. **42**(6): p. 2411-6.
16. Min, J., et al., *Differential neuroprotective effects of carnosine, anserine, and N-acetyl carnosine against permanent focal ischemia*. J Neurosci Res, 2008. **86**(13): p. 2984-91.
17. Mong, M.C., C.Y. Chao, and M.C. Yin, *Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet*. Eur J Pharmacol, 2011. **653**(1-3): p. 82-8.
18. Kamal, M.A., et al., *Influence of genetic knockout of Pept2 on the in vivo disposition of endogenous and exogenous carnosine in wild-type and Pept2 null mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **296**(4): p. R986-91.
19. Barca, A., et al., *Responsiveness of Carnosine Homeostasis Genes in the Pancreas and Brain of Streptozotocin-Treated Mice Exposed to Dietary Carnosine*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(6).
20. Sauerhofer, S., et al., *L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism*. Diabetes, 2007. **56**(10): p. 2425-32.
21. Dunnett, M., et al., *Plasma carnosine concentration: diurnal variation and effects of age, exercise and muscle damage*. Equine Vet J Suppl, 2002(34): p. 283-7.

22. Park, Y.J., S.L. Volpe, and E.A. Decker, *Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(12): p. 4736-9.
23. Baguet, A., et al., *Beta-alanine supplementation reduces acidosis but not oxygen uptake response during high-intensity cycling exercise*. Eur J Appl Physiol, 2010. **108**(3): p. 495-503.
24. Hultman, E. and K. Sahlin, *Acid-base balance during exercise*. Exerc Sport Sci Rev, 1980. **8**: p. 41-128.
25. Derave, W., et al., *beta-Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters*. J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(5): p. 1736-43.
26. Swietach, P., et al., *Coupled Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> transport by cytoplasmic buffers regulates local Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> ion signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. E2064-73.
27. Smith, E.C., *The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine*. J Physiol, 1938. **92**(3): p. 336-43.
28. Vistoli, G., et al., *Predicting the physicochemical profile of diastereoisomeric histidine-containing dipeptides by property space analysis*. Chirality, 2012. **24**(7): p. 566-76.
29. Brown, C.E. and W.E. Antholine, *Chelation chemistry of carnosine. Evidence that mixed complexes may occur in vivo*. The Journal of Physical Chemistry, 1979. **83**(26): p. 3314-3319.
30. Bulman, R.A., *Chelating agents and the regulation of metal ions*. Metal-based drugs, 1994. **1**(2-3): p. 87-106.
31. Uriu-Adams, J.Y. and C.L. Keen, *Copper, oxidative stress, and human health*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(4-5): p. 268-98.
32. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
33. Torreggiani, A., et al., *Vibrational characterisation and biological activity of carnosine and its metal complexes*. Ital J Biochem, 2003. **52**(2): p. 87-97.
34. Torreggiani, A., M. Tamba, and G. Fini, *Binding of copper(II) to carnosine: Raman and IR spectroscopic study*. Biopolymers, 2000. **57**(3): p. 149-59.
35. Schroder, L., C.H. Schmitz, and P. Bachert, *Carnosine as molecular probe for sensitive detection of Cu(II) ions using localized 1H NMR spectroscopy*. J Inorg Biochem, 2008. **102**(2): p. 174-83.
36. Stefanidou, M., et al., *Zinc: a multipurpose trace element*. Arch Toxicol, 2006. **80**(1): p. 1-9.
37. Matsukura, T. and H. Tanaka, *Applicability of zinc complex of L-carnosine for medical use*. Biochemistry (Mosc), 2000. **65**(7): p. 817-23.
38. Pavlov, A.R., et al., *The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1157**(3): p. 304-12.
39. Ha, Y.L. and A.S. Csallany, *alpha-Tocopherol oxidation mediated by superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). II. Identification of the stable alpha-tocopherol oxidation products*. Lipids, 1992. **27**(3): p. 201-5.
40. Klebanov, G.I., et al., *Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine*. Biochem Mol Biol Int, 1997. **43**(1): p. 99-106.
41. Tamba, M. and A. Torreggiani, *Hydroxyl radical scavenging by carnosine and Cu(II)-carnosine complexes: a pulse-radiolysis and spectroscopic study*. Int J Radiat Biol, 1999. **75**(9): p. 1177-88.
42. Hartman, P.E., Z. Hartman, and K.T. Ault, *Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and sustained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid*. Photochem Photobiol, 1990. **51**(1): p. 59-66.
43. Nita, M. and A. Grzybowski, *The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other*



- Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016. **2016**: p. 3164734-3164734.
44. Avery, S.V., *Molecular targets of oxidative stress*. Biochem J, 2011. **434**(2): p. 201-10.
  45. Inagi, R., *Chapter twenty - Inhibitors of Advanced Glycation and Endoplasmic Reticulum Stress*, in *Methods in Enzymology*, P.M. Conn, Editor. 2011, Academic Press. p. 361-380.
  46. Srinivas, U.S., et al., *ROS and the DNA damage response in cancer*. Redox Biol, 2018: p. 101084.
  47. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonylation in human diseases*. Trends Mol Med, 2003. **9**(4): p. 169-76.
  48. Gkogkolou, P. and M. Böhm, *Advanced glycation end products: Key players in skin aging?* Dermato-endocrinology, 2012. **4**(3): p. 259-270.
  49. Miyata, T., K. Kurokawa, and C. Van Ypersele De Strihou, *Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(9): p. 1744-52.
  50. Ott, C., et al., *Role of advanced glycation end products in cellular signaling*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 411-29.
  51. Baynes, J.W., *Chemical modification of proteins by lipids in diabetes*. Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(9): p. 1159-65.
  52. Marnett, L.J., *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*. Mutat Res, 1999. **424**(1-2): p. 83-95.
  53. Negre-Salvayre, A., et al., *Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors*. Br J Pharmacol, 2008. **153**(1): p. 6-20.
  54. Barski, O.A., et al., *Dietary carnosine prevents early atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-null mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(6): p. 1162-70.
  55. Freund, M.A., B. Chen, and E.A. Decker, *The Inhibition of Advanced Glycation End Products by Carnosine and Other Natural Dipeptides to Reduce Diabetic and Age-Related Complications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2018. **17**(5): p. 1367-1378.
  56. Brings, S., et al., *A scavenger peptide prevents methylglyoxal induced pain in mice*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(3): p. 654-662.
  57. Drozak, J., et al., *Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1)*. J Biol Chem, 2010. **285**(13): p. 9346-56.
  58. Kalyankar, G.D. and A. Meister, *Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides*. J Biol Chem, 1959. **234**: p. 3210-8.
  59. Winnick, T. and R.E. Winnick, *Pathways and the physiological site of anserine formation*. Nature, 1959. **183**(4673): p. 1466-8.
  60. Miyaji, T., et al., *Expression profiles of carnosine synthesis-related genes in mice after ingestion of carnosine or ss-alanine*. J Int Soc Sports Nutr, 2012. **9**(1): p. 15.
  61. Veiga-da-Cunha, M., et al., *Metabolite proofreading in carnosine and homocarnosine synthesis: molecular identification of PM20D2 as beta-alanyl-lysine dipeptidase*. J Biol Chem, 2014. **289**(28): p. 19726-36.
  62. Matsuoka, M., T. Nakajima, and I. Sano, *Identification of alpha-(beta-alanyl)-lysine in rabbit muscle*. Biochim Biophys Acta, 1969. **177**(1): p. 169-71.
  63. Harris, R.C., et al., *The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis*. Amino Acids, 2006. **30**(3): p. 279-89.
  64. Wu, G., *Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition*. J Anim Sci Biotechnol, 2014. **5**(1): p. 34.
  65. Wang, Y., H. Xu, and R.H. White, *beta-alanine biosynthesis in Methanocaldococcus jannaschii*. J Bacteriol, 2014. **196**(15): p. 2869-75.

66. Wilson, K., et al., *Metabolism of Beta-Alanine in Rat Liver: Degradation to Acetyl-CoA and Carboxylation to 2-(aminomethyl)-malonate*. The FASEB Journal, 2017. **31**(1\_supplement): p. 655.3-655.3.
67. Fritzon, P. and A. Pihl, *The catabolism of C14-labeled uracil, dihydrouracil, and beta-ureidopropionic acid in the intact rat*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 229-35.
68. Stellingwerff, T., et al., *Effect of two beta-alanine dosing protocols on muscle carnosine synthesis and washout*. Amino Acids, 2012. **42**(6): p. 2461-72.
69. Stegen, S., et al., *Meal and beta-alanine coingestion enhances muscle carnosine loading*. Med Sci Sports Exerc, 2013. **45**(8): p. 1478-85.
70. Lippert, B., et al., *4-Amino-hex-5-enoic Acid, a Selective Catalytic Inhibitor of 4-Aminobutyric-Acid Aminotransferase in Mammalian Brain*. European Journal of Biochemistry, 1977. **74**(3): p. 441-445.
71. Rodionov, R.N., et al., *AGXT2: a promiscuous aminotransferase*. Trends Pharmacol Sci, 2014. **35**(11): p. 575-82.
72. Yamada, S., *12 - Biosynthesis and degradation of bioactive imidazole-related dipeptides*, in *Marine Enzymes for Biocatalysis*, A. Trincone, Editor. 2013, Woodhead Publishing. p. 295-331.
73. Drozak, J., et al., *Molecular identification of carnosine N-methyltransferase as chicken histamine N-methyltransferase-like protein (hnmt-like)*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64805.
74. Tamba, M. and A. Torreggiani, *A pulse radiolysis study of carnosine in aqueous solution*. Int J Radiat Biol, 1998. **74**(3): p. 333-40.
75. Drozak, J., et al., *UPF0586 Protein C9orf41 Homolog Is Anserine-producing Methyltransferase*. J Biol Chem, 2015. **290**(28): p. 17190-205.
76. Kwiatkowski, S., A. Kiersztan, and J. Drozak, *Biosynthesis of Carnosine and Related Dipeptides in Vertebrates*. Curr Protein Pept Sci, 2018. **19**(8): p. 771-789.
77. Perim, P., et al., *Can the Skeletal Muscle Carnosine Response to Beta-Alanine Supplementation Be Optimized?* Frontiers in Nutrition, 2019. **6**(135).
78. Teufel, M., et al., *Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6521-31.
79. Pegova, A., H. Abe, and A. Boldyrev, *Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2000. **127**(4): p. 443-6.
80. Pavlin, M., et al., *Carnosine and Homocarnosine Degradation Mechanisms by the Human Carnosinase Enzyme CN1: Insights from Multiscale Simulations*. Biochemistry, 2016. **55**(19): p. 2772-84.
81. Pandya, V., et al., *Mass spectrometry assay for studying kinetic properties of dipeptidases: characterization of human and yeast dipeptidases*. Anal Biochem, 2011. **418**(1): p. 134-42.
82. Jackson, M.C., C.M. Kucera, and J.F. Lenney, *Purification and properties of human serum carnosinase*. Clin Chim Acta, 1991. **196**(2-3): p. 193-205.
83. von Heijne, G., *Signal sequences. The limits of variation*. J Mol Biol, 1985. **184**(1): p. 99-105.
84. Riedl, E., et al., *A CTG polymorphism in the CNDP1 gene determines the secretion of serum carnosinase in Cos-7 transfected cells*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2410-3.
85. Riedl, E., et al., *N-glycosylation of carnosinase influences protein secretion and enzyme activity: implications for hyperglycemia*. Diabetes, 2010. **59**(8): p. 1984-90.
86. Janssen, B., et al., *Carnosine as a protective factor in diabetic nephropathy: association with a leucine repeat of the carnosinase gene CNDP1*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2320-7.
87. Peters, V., et al., *Relevance of allosteric conformations and homocarnosine concentration on carnosinase activity*. Amino Acids, 2010. **38**(5): p. 1607-15.
88. Baguet, A., et al., *Does low serum carnosinase activity favor high-intensity exercise capacity?* J Appl Physiol (1985), 2014. **116**(5): p. 553-9.

89. Peters, V., et al., *Allosteric inhibition of carnosinase (CN1) by inducing a conformational shift*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2017. **32**(1): p. 1102-1110.
90. Peters, V., et al., *Carnosine metabolism in diabetes is altered by reactive metabolites*. Amino Acids, 2015. **47**(11): p. 2367-76.
91. *IDF Diabetes Atlas, 8th Edition*. 2017 [cited 2019; Available from: <https://www.diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>].
92. Nickerson, H.D. and S. Dutta, *Diabetic complications: current challenges and opportunities*. Journal of cardiovascular translational research, 2012. **5**(4): p. 375-379.
93. Rabkin, R., *Diabetic nephropathy*. Clin Cornerstone, 2003. **5**(2): p. 1-11.
94. Abbasi, M.A., G.M. Chertow, and Y.N. Hall, *End-stage renal disease*. BMJ clinical evidence, 2010. **2010**: p. 2002.
95. Lim, A., *Diabetic nephropathy - complications and treatment*. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2014. **7**: p. 361-81.
96. Tervaert, T.W., et al., *Pathologic classification of diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(4): p. 556-63.
97. *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(2 Suppl 1): p. S1-266.
98. Hostetter, T.H., *Hypertrophy and hyperfunction of the diabetic kidney*. The Journal of clinical investigation, 2001. **107**(2): p. 161-162.
99. Brenner, B.M., E.V. Lawler, and H.S. Mackenzie, *The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology*. Kidney Int, 1996. **49**(6): p. 1774-7.
100. Tonneijck, L., et al., *Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2017. **28**(4): p. 1023-1039.
101. Vallon, V. and R. Komers, *Pathophysiology of the diabetic kidney*. Compr Physiol, 2011. **1**(3): p. 1175-232.
102. Peppas, M., J. Uribarri, and H. Vlassara, *Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and What Works*. Clinical Diabetes, 2003. **21**(4): p. 186.
103. Silbiger, S., et al., *Nonenzymatic glycation of mesangial matrix and prolonged exposure of mesangial matrix to elevated glucose reduces collagen synthesis and proteoglycan charge*. Kidney Int, 1993. **43**(4): p. 853-64.
104. Schmidt, A.M., et al., *RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products*. Diabetes, 1996. **45** Suppl 3: p. S77-80.
105. Bierhaus, A., et al., *Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products*. J Mol Med (Berl), 2005. **83**(11): p. 876-86.
106. Coughlan, M.T., et al., *RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(4): p. 742-52.
107. Brownlee, M., *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1615-25.
108. Komers, R. and S. Anderson, *Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(6): p. F1121-37.
109. Goligorsky, M.S., J. Chen, and S. Brodsky, *Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy : focus on nitric oxide*. Hypertension, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 744-8.
110. Bucala, R., K.J. Tracey, and A. Cerami, *Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes*. J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 432-8.
111. Govers, R. and T.J. Rabelink, *Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(2): p. F193-206.
112. Nieuwdorp, M., et al., *Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 480-6.

113. Dai, T., et al., *Glucose and diabetes: effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton*. *Kidney Int*, 2006. **69**(5): p. 806-14.
114. Schiffer, M., et al., *Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(6): p. 807-16.
115. Wendt, T.M., et al., *RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(4): p. 1123-37.
116. Mundel, P. and S.J. Shankland, *Podocyte biology and response to injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(12): p. 3005-15.
117. Huang, H.C. and P.A. Preisig, *G1 kinases and transforming growth factor-beta signaling are associated with a growth pattern switch in diabetes-induced renal growth*. *Kidney Int*, 2000. **58**(1): p. 162-72.
118. Satriano, J. and V. Vallon, *Primary kidney growth and its consequences at the onset of diabetes mellitus*. *Amino Acids*, 2006. **31**(1): p. 1-9.
119. Pedersen, S.B., A. Flyvbjerg, and B. Richelsen, *Inhibition of renal ornithine decarboxylase activity prevents kidney hypertrophy in experimental diabetes*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(2 Pt 1): p. C453-6.
120. Ishii, H., et al., *Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor*. *Science*, 1996. **272**(5262): p. 728-31.
121. Pfaff, I.L., H.J. Wagner, and V. Vallon, *Immunolocalization of protein kinase C isoenzymes alpha, beta1 and beta11 in rat kidney*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(9): p. 1861-73.
122. Han, D.C., et al., *Therapy with antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **278**(4): p. F628-34.
123. Nangaku, M., *Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(1): p. 17-25.
124. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(3): p. 341-50.
125. Phillips, A.O. and R. Steadman, *Diabetic nephropathy: the central role of renal proximal tubular cells in tubulointerstitial injury*. *Histol Histopathol*, 2002. **17**(1): p. 247-52.
126. Gross, J.L., et al., *Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment*. *Diabetes Care*, 2005. **28**(1): p. 164-76.
127. Radcliffe, N.J., et al., *Clinical predictive factors in diabetic kidney disease progression*. *Journal of diabetes investigation*, 2017. **8**(1): p. 6-18.
128. Amann, B., R. Tinzmann, and B. Angelkort, *ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1*. *Diabetes Care*, 2003. **26**(8): p. 2421-5.
129. Parving, H.H., et al., *The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(12): p. 870-8.
130. Alaveras, A.E., et al., *Promoters of progression of diabetic nephropathy: the relative roles of blood glucose and blood pressure control*. *Nephrol Dial Transplant*, 1997. **12 Suppl 2**: p. 71-4.
131. Gross, J.L., et al., *Effect of a chicken-based diet on renal function and lipid profile in patients with type 2 diabetes: a randomized crossover trial*. *Diabetes Care*, 2002. **25**(4): p. 645-51.
132. Nathan, D.M., et al., *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(14): p. 977-86.
133. *Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial*. *The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group*. *Kidney Int*, 1995. **47**(6): p. 1703-20.

134. Riedl, E., et al., *Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(2): p. 279-88.
135. Aldini, G., et al., *The carbonyl scavenger carnosine ameliorates dyslipidaemia and renal function in Zucker obese rats*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(6): p. 1339-54.
136. Lee, Y.T., et al., *Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation*. Eur J Pharmacol, 2005. **513**(1-2): p. 145-50.
137. Albrecht, T., et al., *Carnosine Attenuates the Development of both Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy in BTBR ob/ob Mice*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44492.
138. Yay, A., et al., *Antioxidant effect of carnosine treatment on renal oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats*. Biotech Histochem, 2014. **89**(8): p. 552-7.
139. Peters, V., et al., *Carnosine treatment in combination with ACE inhibition in diabetic rats*. Regul Pept, 2014. **194-195**: p. 36-40.
140. Iacobini, C., et al., *FL-926-16, a novel bioavailable carnosinase-resistant carnosine derivative, prevents onset and stops progression of diabetic nephropathy in db/db mice*. Br J Pharmacol, 2018. **175**(1): p. 53-66.
141. Jia, H., et al., *Carnosine inhibits high glucose-induced mesangial cell proliferation through mediating cell cycle progression*. Regul Pept, 2009. **154**(1-3): p. 69-76.
142. Menini, S., et al., *D-Carnosine octylester attenuates atherosclerosis and renal disease in ApoE null mice fed a Western diet through reduction of carbonyl stress and inflammation*. British journal of pharmacology, 2012. **166**(4): p. 1344-1356.
143. Albrecht, T., et al., *L-Carnosine attenuates the development of diabetic nephropathy in the BTBR ob/ob mouse model*. Diabetologie und Stoffwechsel, 2015. **10**(S 01): p. P64.
144. Soliman, K.M., A.N. Mohamed, and N.S. Metwally, *Attenuation of Some Metabolic Deteriorations Induced by Diabetes Mellitus Using Carnosine* Journal of Applied Sciences, 2007. **7**: p. 2252-2260.
145. Nagai, K., et al., *Role of L-carnosine in the control of blood glucose, blood pressure, thermogenesis, and lipolysis by autonomic nerves in rats: involvement of the circadian clock and histamine*. Amino Acids, 2012. **43**(1): p. 97-109.
146. Cripps, M.J., et al., *Carnosine scavenging of glucolipotoxic free radicals enhances insulin secretion and glucose uptake*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 13313.
147. Aydin, A.F., et al., *Carnosine decreased oxidation and glycation products in serum and liver of high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced diabetic rats*. Int J Exp Pathol, 2017. **98**(5): p. 278-288.
148. Li, L., et al., *Formation and inhibition of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in saccharide-lysine model systems during microwave heating*. Molecules, 2012. **17**(11): p. 12758-70.
149. Aydin, A.F., et al., *Carnosine and taurine treatments diminished brain oxidative stress and apoptosis in D-galactose aging model*. Metab Brain Dis, 2016. **31**(2): p. 337-45.
150. Kim, M.Y., et al., *Effects of  $\alpha$ -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats*. Nutrition research and practice, 2011. **5**(5): p. 421-428.
151. Aydin, A.F., et al., *The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats*. Biogerontology, 2010. **11**(1): p. 103-9.
152. Fiorentino, T.V., et al., *Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(32): p. 5695-703.
153. Mooyaart, A.L., et al., *Association between CNDP1 genotype and diabetic nephropathy is sex specific*. Diabetes, 2010. **59**(6): p. 1555-9.
154. Albrecht, T., et al., *The CNDP1 (CTG)5 Polymorphism Is Associated with Biopsy-Proven Diabetic Nephropathy, Time on Hemodialysis, and Diabetes Duration*. J Diabetes Res, 2017. **2017**: p. 9506730.

155. Freedman, B.I., et al., *A leucine repeat in the carnosinase gene CNDP1 is associated with diabetic end-stage renal disease in European Americans*. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. **22**(4): p. 1131-5.
156. Kurashige, M., et al., *The influence of a single nucleotide polymorphism within CNDP1 on susceptibility to diabetic nephropathy in Japanese women with type 2 diabetes*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e54064.
157. Mooyaart, A.L., et al., *Lower frequency of the 5/5 homozygous CNDP1 genotype in South Asian Surinamese*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009. **85**(3): p. 272-8.
158. Yadav, A.K., et al., *Association of CTG repeat polymorphism in carnosine dipeptidase 1 (CNDP1) gene with diabetic nephropathy in north Indians*. *Indian J Med Res*, 2016. **144**(1): p. 32-37.
159. Kilis-Pstrusinska, K., D. Zwolinska, and W. Grzeszczak, *Is carnosinase 1 gene (CNDP1) polymorphism associated with chronic kidney disease progression in children and young adults? results of a family-based study*. *Arch Med Res*, 2010. **41**(5): p. 356-62.
160. Peters, V., et al., *CNDP1 genotype and renal survival in pediatric nephropathies*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2016. **29**(7): p. 827-33.
161. Qiu, J., et al., *Identification and characterisation of carnostatine (SAN9812), a potent and selective carnosinase (CN1) inhibitor with in vivo activity*. *Amino Acids*, 2019. **51**(1): p. 7-16.
162. de Courten, B., et al., *Effects of carnosine supplementation on glucose metabolism: Pilot clinical trial*. *Obesity (Silver Spring)*, 2016. **24**(5): p. 1027-34.
163. Liu, Y., et al., *A Dietary Supplement Containing Cinnamon, Chromium and Carnosine Decreases Fasting Plasma Glucose and Increases Lean Mass in Overweight or Obese Pre-Diabetic Subjects: A Randomized, Placebo-Controlled Trial*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0138646.
164. Houjeghani, S., et al., *l-Carnosine supplementation attenuated fasting glucose, triglycerides, advanced glycation end products, and tumor necrosis factor-alpha levels in patients with type 2 diabetes: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial*. *Nutr Res*, 2018. **49**: p. 96-106.
165. Elbarbary, N.S., et al., *The effect of 12 weeks carnosine supplementation on renal functional integrity and oxidative stress in pediatric patients with diabetic nephropathy: a randomized placebo-controlled trial*. *Pediatr Diabetes*, 2018. **19**(3): p. 470-477.
166. Hagan, C. *When are mice considered old ?* 2017 [cited 2019 June 13, 2019]; Available from: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/november/when-are-mice-considered-old#>.
167. Weger, B.D., et al., *Extensive Regulation of Diurnal Transcription and Metabolism by Glucocorticoids*. *PLoS Genet*, 2016. **12**(12): p. e1006512.
168. Wirtz, M., M. Droux, and R. Hell, *O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 2004. **55**(404): p. 1785-98.
169. Weigand, T., et al., *Carnosine Catalyzes the Formation of the Oligo/Polymeric Products of Methylglyoxal*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **46**(2): p. 713-726.
170. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
171. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
172. Klika, K.D., *The Application of Simple and Easy to Implement Decoupling Pulse Scheme Combinations to Effect Decoupling of Large Values with Reduced Artifacts*. *International Journal of Spectroscopy*, 2014. **2014**: p. 9.
173. Mäki, J., et al., *Restricted rotation/tautomeric equilibrium and determination of the site and extent of protonation in bi-imidazole nucleosides by multinuclear NMR and GIAO-DFT calculations*. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2005. **18**(3): p. 240-249.

174. Virta, P., et al., *Synthesis, characterisation and theoretical calculations of 2,6-diaminopurine etheno derivatives*. *Org Biomol Chem*, 2005. **3**(16): p. 2924-9.
175. Fox, J., *Effect Displays in R for Generalised Linear Models*. Vol. 08. 2002.
176. Lenth, R.V., *Least-Squares Means: The R Package lsmeans*. 2016, 2016. **69**(1): p. 33.
177. Wood, T., *Carnosine and carnosinase in rat tissue*. *Nature*, 1957. **180**(4575): p. 39-40.
178. Margolis, F.L., et al., *Purification, characterization and immunocytochemical localization of mouse kidney carnosinase*. *Biochim Biophys Acta*, 1983. **744**(3): p. 237-48.
179. Vistoli, G., et al., *Homology modeling of human serum carnosinase, a potential medicinal target, and MD simulations of its allosteric activation by citrate*. *J Med Chem*, 2006. **49**(11): p. 3269-77.
180. Lenney, J.F., et al., *Human serum carnosinase: characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium*. *Clin Chim Acta*, 1982. **123**(3): p. 221-31.
181. Unno, H., et al., *Structural basis for substrate recognition and hydrolysis by mouse carnosinase CN2*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(40): p. 27289-99.
182. Okumura, N. and T. Takao, *The zinc form of carnosine dipeptidase 2 (CN2) has dipeptidase activity but its substrate specificity is different from that of the manganese form*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **494**(3-4): p. 484-490.
183. Otani, H., et al., *Identification and characterization of a mouse dipeptidase that hydrolyzes L-carnosine*. *J Biochem*, 2005. **137**(2): p. 167-75.
184. Peters, V., J. Zschocke, and C.P. Schmitt, *Carnosinase, diabetes mellitus and the potential relevance of carnosinase deficiency*. *J Inher Metab Dis*, 2018. **41**(1): p. 39-47.
185. Peters, V., et al., *Anserine inhibits carnosine degradation but in human serum carnosinase (CN1) is not correlated with histidine dipeptide concentration*. *Clin Chim Acta*, 2011. **412**(3-4): p. 263-7.
186. Davalli, P., et al., *ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases*. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. **2016**: p. 3565127.
187. Sergiev, P.V., O.A. Dontsova, and G.V. Berezkin, *Theories of aging: an ever-evolving field*. *Acta Naturae*, 2015. **7**(1): p. 9-18.
188. Kohen, R., et al., *Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(9): p. 3175-9.
189. Yue, F., et al., *A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome*. *Nature*, 2014. **515**(7527): p. 355-64.
190. Abe, H., *Chapter 14 Histidine-related dipeptides: distribution, metabolism, and physiological function*, in *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, P.W. Hochachka and T.P. Mommsen, Editors. 1995, Elsevier. p. 309-333.
191. Jackson, M.C. and J.F. Lenney, *The distribution of carnosine and related dipeptides in rat and human tissues*. *Inflamm Res*, 1996. **45**(3): p. 132-5.
192. Aldini, G., et al., *Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives*. *Biofactors*, 2005. **24**(1-4): p. 77-87.
193. Vistoli, G., et al., *Quenching activity of carnosine derivatives towards reactive carbonyl species: Focus on alpha-(methylglyoxal) and beta-(malondialdehyde) dicarbonyls*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **492**(3): p. 487-492.
194. Peters, V., et al., *Protective Actions of Anserine Under Diabetic Conditions*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(9).
195. Teuscher, N.S., et al., *Carnosine uptake in rat choroid plexus primary cell cultures and choroid plexus whole tissue from PEPT2 null mice*. *J Neurochem*, 2004. **89**(2): p. 375-82.
196. Rubio-Aliaga, I., et al., *Targeted disruption of the peptide transporter Pept2 gene in mice defines its physiological role in the kidney*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(9): p. 3247-52.

197. Geissler, S., et al., *The bioactive dipeptide anserine is transported by human proton-coupled peptide transporters*. Febs j, 2010. **277**(3): p. 790-5.
198. Jappar, D., et al., *Transport mechanisms of carnosine in SKPT cells: contribution of apical and basolateral membrane transporters*. Pharm Res, 2009. **26**(1): p. 172-81.
199. Irie, M., et al., *Efflux properties of basolateral peptide transporter in human intestinal cell line Caco-2*. Pflugers Arch, 2004. **449**(2): p. 186-94.
200. Jozanović Horvat, M., et al., *Analytical Characterization and Quantification of Histidine Dipeptides, Carnosine and Anserine by Modeling of Potentiometric Titration Data*. Vol. 10. 2015. 5787-5799.
201. Bartlett, P.D., *The chemical properties of the methyl group*. Journal of Chemical Education, 1953. **30**(1): p. 22.
202. Everaert, I., et al., *Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle*. Eur J Appl Physiol, 2013. **113**(5): p. 1169-79.
203. Helal, I., et al., *Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(5): p. 293-300.
204. Ficociello, L.H., et al., *Renal hyperfiltration and the development of microalbuminuria in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32**(5): p. 889-93.
205. Mogensen, C.E., *Glomerular hyperfiltration in human diabetes*. Diabetes Care, 1994. **17**(7): p. 770-5.
206. Drummond, K. and M. Mauer, *The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1580-7.
207. Zelmanovitz, T., et al., *Diabetic nephropathy*. Diabetology & metabolic syndrome, 2009. **1**(1): p. 10-10.
208. Sasaki, Y., et al., *Estimation of glomerular filtration rate in conscious mice using a simplified equation*. Physiological reports, 2014. **2**(8): p. e12135.
209. Qi, Z., et al., *Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(3): p. F590-6.
210. Hackbarth, H. and D.E. Harrison, *Changes with age in renal function and morphology in C57BL/6, CBA/HT6, and B6CBAF1 mice*. J Gerontol, 1982. **37**(5): p. 540-7.
211. Weinstein, J.R. and S. Anderson, *The aging kidney: physiological changes*. Advances in chronic kidney disease, 2010. **17**(4): p. 302-307.
212. Poudel, B., et al., *Prevalence and association of microalbuminuria in essential hypertensive patients*. North American journal of medical sciences, 2012. **4**(8): p. 331-335.
213. Saha, T.K., et al., *Correlation of Microalbuminuria with Estimated GFR (eGFR) by Cockcroft-Gault and MDRD Formula in Type 2 Diabetics and Hypertensives*. Indian journal of clinical biochemistry : IJCB, 2015. **30**(3): p. 271-274.
214. Glassock, R.J., *Is the presence of microalbuminuria a relevant marker of kidney disease?* Current hypertension reports, 2010. **12**(5): p. 364-368.
215. Russo, L.M., et al., *Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2009. **20**(3): p. 489-494.
216. Miller, W.G., et al., *Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion*. Clin Chem, 2009. **55**(1): p. 24-38.
217. Kulis-Horn, R.K., M. Persicke, and J. Kalinowski, *Histidine biosynthesis, its regulation and biotechnological application in Corynebacterium glutamicum*. Microbial biotechnology, 2014. **7**(1): p. 5-25.
218. Spitteller, P.v.N., F, *Biosynthesis of  $\beta$ -Amino Acids*, in *Highlights in Bioorganic Chemistry*. 2004. p. 90-106.
219. Ramjee, M.K., et al., *Escherichia coli L-aspartate-alpha-decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry*. Biochem J, 1997. **323 ( Pt 3)**: p. 661-9.



220. van de Poll, M.C., et al., *Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. **79**(2): p. 185-197.
221. Brosnan, M.E. and J.T. Brosnan, *Renal arginine metabolism*. J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2791S-2795S; discussion 2796S-2797S.
222. Kalhan, S.C. and R.W. Hanson, *Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino acid*. J Biol Chem, 2012. **287**(24): p. 19786-91.
223. Keeney, J.T.R., et al., *Superoxide induces protein oxidation in plasma and TNF- $\alpha$  elevation in macrophage culture: Insights into mechanisms of neurotoxicity following doxorubicin chemotherapy*. Cancer letters, 2015. **367**(2): p. 157-161.
224. Haigis, M.C. and B.A. Yankner, *The aging stress response*. Molecular cell, 2010. **40**(2): p. 333-344.
225. Yang, F., et al., *mTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits*. Behav Brain Res, 2014. **264**: p. 82-90.
226. Tam, Z.Y., et al., *Effects of lithium on age-related decline in mitochondrial turnover and function in Caenorhabditis elegans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014. **69**(7): p. 810-20.
227. Lee, C.K., et al., *The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(8): p. 1043-57.
228. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016. **2016**: p. 1245049-1245049.
229. Aydin, F., et al., *Carnosine Treatment Diminished Oxidative Stress and Glycation Products in Serum and Tissues of D-Galactose-Treated Rats*. Curr Aging Sci, 2018. **11**(1): p. 10-15.
230. Boldyrev, A., et al., *Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2004. **137**(1): p. 81-8.
231. Lushchak, V.I., *Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions*. J Amino Acids, 2012. **2012**: p. 736837.
232. Fedorova, M., R.C. Bollineni, and R. Hoffmann, *Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies*. Mass Spectrom Rev, 2014. **33**(2): p. 79-97.
233. Nevin, C., et al., *Investigating the Glycating Effects of Glucose, Glyoxal and Methylglyoxal on Human Sperm*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 9002.
234. Shamsaldeen, Y.A., et al., *Methylglyoxal, A Metabolite Increased in Diabetes is Associated with Insulin Resistance, Vascular Dysfunction and Neuropathies*. Curr Drug Metab, 2016. **17**(4): p. 359-67.
235. Matamoros, M.A., et al., *Protein Carbonylation and Glycation in Legume Nodules*. Plant Physiol, 2018. **177**(4): p. 1510-1528.
236. Ahmed, M.U., et al., *N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins*. Biochem J, 1997. **324** ( Pt 2): p. 565-70.
237. Liggins, J. and A.J. Furth, *Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1361**(2): p. 123-30.
238. Thornalley, P.J., *The glyoxalase system in health and disease*. Mol Aspects Med, 1993. **14**(4): p. 287-371.
239. *USDA food composition databases*. 2018 [cited 2019; Available from: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/10106?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&glookup=kidney+meat&ds=&qt=&qp=&qg=&qn=&q=&ing=>
240. Reimold, A.M., *New indications for treatment of chronic inflammation by TNF-alpha blockade*. Am J Med Sci, 2003. **325**(2): p. 75-92.

241. Feghali, C.A. and T.M. Wright, *Cytokines in acute and chronic inflammation*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d12-26.
242. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013. **53**: p. 401-26.
243. Shanmugam, G., et al., *A biphasic effect of TNF-alpha in regulation of the Keap1/Nrf2 pathway in cardiomyocytes*. Redox Biol, 2016. **9**: p. 77-89.
244. Rushworth, S.A., S. Shah, and D.J. MacEwan, *TNF mediates the sustained activation of Nrf2 in human monocytes*. J Immunol, 2011. **187**(2): p. 702-7.
245. Jaiswal, A.K., *Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(10): p. 1199-207.
246. Um, H.C., et al., *Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells*. Nitric Oxide, 2011. **25**(2): p. 161-8.
247. Oppermann, H., et al., *Carnosine influences transcription via epigenetic regulation as demonstrated by enhanced histone acetylation of the pyruvate dehydrogenase kinase 4 promoter in glioblastoma cells*. Amino Acids, 2019. **51**(1): p. 61-71.
248. Kulebyakin, K., et al., *Carnosine protects neurons against oxidative stress and modulates the time profile of MAPK cascade signaling*. Amino Acids, 2012. **43**(1): p. 91-6.
249. Iovine, B., et al., *Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production*. Cancer Lett, 2012. **315**(2): p. 122-8.
250. Qi, Z., et al., *l-Homocarnosine, l-carnosine, and anserine attenuate brain oxidative damage in a pentylenetetrazole-induced epilepsy model of ovariectomized rats*. 3 Biotech, 2018. **8**(8): p. 363.
251. Milewski, K., et al., *Carnosine Reduces Oxidative Stress and Reverses Attenuation of Righting and Postural Reflexes in Rats with Thioacetamide-Induced Liver Failure*. Neurochemical research, 2016. **41**(1-2): p. 376-384.
252. Forman, H.J., M. Maiorino, and F. Ursini, *Signaling functions of reactive oxygen species*. Biochemistry, 2010. **49**(5): p. 835-42.
253. Paulsen, C.E. and K.S. Carroll, *Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches*. ACS Chem Biol, 2010. **5**(1): p. 47-62.
254. Lubos, E., J. Loscalzo, and D.E. Handy, *Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. Antioxidants & redox signaling, 2011. **15**(7): p. 1957-1997.
255. McClung, J.P., et al., *Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(24): p. 8852-8857.
256. Bruunsgaard, H., M. Pedersen, and B.K. Pedersen, *Aging and proinflammatory cytokines*. Curr Opin Hematol, 2001. **8**(3): p. 131-6.
257. Paolisso, G., et al., *Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha*. Am J Physiol, 1998. **275**(2): p. E294-9.
258. Kloska, D., et al., *Nrf2 in aging - Focus on the cardiovascular system*. Vascul Pharmacol, 2019. **112**: p. 42-53.
259. George, L., M.F. Lokhandwala, and M. Asghar, *Exercise activates redox-sensitive transcription factors and restores renal D1 receptor function in old rats*. American journal of physiology. Renal physiology, 2009. **297**(5): p. F1174-F1180.
260. Franklin, C.C., et al., *Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase*. Molecular aspects of medicine, 2009. **30**(1-2): p. 86-98.
261. Yang, H., et al., *Nrf1 and Nrf2 regulate rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit transcription indirectly via NF-kappaB and AP-1*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(14): p. 5933-5946.
262. Novodvorsky, P. and T.J. Chico, *The role of the transcription factor KLF2 in vascular development and disease*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. **124**: p. 155-88.

263. Bao, Y., et al., *Effects of Dietary L-carnosine and Alpha-lipoic Acid on Growth Performance, Blood Thyroid Hormones and Lipid Profiles in Finishing Pigs*. Asian-Australas J Anim Sci, 2015. **28**(10): p. 1465-70.
264. Schmohl, F., et al., *CNDP1 knockout in zebrafish alters the amino acid metabolism, restrains weight gain, but does not protect from diabetic complications*. Cell Mol Life Sci, 2019.
265. Polyzos, S.A., J. Kountouras, and C.S. Mantzoros, *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics*. Metabolism, 2019. **92**: p. 82-97.
266. Mandal, R., et al., *Organ weight changes associated with body mass index determined from a medical autopsy population*. Am J Forensic Med Pathol, 2012. **33**(4): p. 382-9.
267. Berglund, E.D., et al., *Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains*. Diabetes, 2008. **57**(7): p. 1790-9.
268. Togashi, Y., et al., *Evaluation of the appropriateness of using glucometers for measuring the blood glucose levels in mice*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25465.
269. Jellinger, P.S., *Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance*. Clin Cornerstone, 2007. **8 Suppl 7**: p. S30-42.
270. Cefalu, W.T., *Insulin resistance: cellular and clinical concepts*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(1): p. 13-26.
271. Gerich, J.E., *Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications*. Diabet Med, 2010. **27**(2): p. 136-42.
272. Stumvoll, M., et al., *Renal glucose production and utilization: new aspects in humans*. Diabetologia, 1997. **40**(7): p. 749-57.
273. Stumvoll, M., et al., *Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity*. Am J Physiol, 1998. **274**(5): p. E817-26.

## 7. Eigene Publikationen

**Weigand, T.**, B. Singler, T. Fleming, P. Nawroth, K.D. Klika, C. Thiel, H. Baelde, S.F. Garbade, A.H. Wagner, M. Hecker, B.A. Yard, A. Amberger, J. Zschocke, C.P. Schmitt, and V. Peters, *Carnosine Catalyzes the Formation of the Oligo/Polymeric Products of Methylglyoxal*. Cell Physiol Biochem, 2018. **46**(2): p. 713-726.

Schmohl, F., V. Peters, C.P. Schmitt, G. Poschet, M. Buttner, X. Li, **T. Weigand**, T. Poth, N. Volk, J. Morgenstern, T. Fleming, P.P. Nawroth, and J. Kroll, *CNDP1 knockout in zebrafish alters the amino acid metabolism, restrains weight gain, but does not protect from diabetic complications*. Cell Mol Life Sci, 2019.

Peters, V., V. Calabrese, E. Forsberg, N. Volk, T. Fleming, H. Baelde, **T. Weigand**, C. Thiel, A. Trovato, M. Scuto, S. Modafferi, and C.P. Schmitt, *Protective Actions of Anserine Under Diabetic Conditions*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).

Peters, V., C.P. Schmitt, **T. Weigand**, K. Klingbeil, C. Thiel, A. van den Berg, V. Calabrese, P. Nawroth, T. Fleming, E. Forsberg, A.H. Wagner, M. Hecker, and G. Vistoli, *Allosteric inhibition of carnosinase (CN1) by inducing a conformational shift*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2017. **32**(1): p. 1102-1110.