

Aus der V. Medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Krämer)

Über Carnosinasurie und die Rolle bei der diabetischen Nephropathie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu Heidelberg

vorgelegt von
Anna Sofia Herold

aus
Heidelberg
2020

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Benito Yard

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG.....	8
1.1 Diabetische Nephropathie.....	8
1.1.1 Allgemeines zum Diabetes mellitus	8
1.1.2 Pathogenese und Epidemiologie der diabetischen Nephropathie.....	9
1.2 L-Carnosin und Carnosinase.....	12
1.2.1 Eigenschaften von L-Carnosin.....	12
1.2.2 Humane Serum-Carnosinase	14
1.2.3 Bedeutung der CN1 bei der diabetischen Nephropathie	15
1.3 Fragestellung.....	17
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Antikörper.....	19
2.1.2 Primer	19
2.1.3 Chemikalien	19
2.1.4 Lösungen und Puffer	20
2.1.5 Kits	21
2.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.7 Geräte und Software.....	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Patientenrekrutierung	22
2.2.2 CN1-Konzentration in Serum und Urin	23
2.2.3 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von CN1	23
2.2.4 CNDP1 Genotypisierung.....	24
3. ERGEBNISSE.....	27
3.1 Nachweis von CN1 im Urin.....	27
3.2 CNU bei T2DM und CKD.....	29

3.3 Korrelationen zwischen CNU, Albuminurie und Nierenfunktion	32
3.4 CNU und der (CTG)n-Polymorphismus	37
3.5 CNU und Hyperglykämie	39
4. DISKUSSION	41
5. ZUSAMMENFASSUNG	47
6. LITERATURVERZEICHNIS	48
7. LEBENSLAUF	56
8. DANKSAGUNG	58

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5L/5L	Homozygotie im CNDP1-Genotyp mit 5 Leucin-Repeats
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
ACE	Angiotensin-I-Converting-Enzym
ACR	Albumin-Kreatinin-Quotient
AGE	advanced glycation endproducts (engl.)
ALK5	activin receptor-like kinase 5 (engl.)
Aq. dest.	Aqua destillata (lat.)
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BTBR	black and tan, brachyury (engl.)
CN1	Serum-Carnosinase 1 (EC 3.4.13.20)
CN2	Zytosolische nichtspezifische Dipeptidase (EC 3.4.13.18)
CNDP1	Carnosinase Dipeptidase 1
CTG5	Allelvariante im CNDP1-Gen mit 5 Leucin-Repeats
db/db Maus	Diabetisches Mausmodell mit homozygoter Punktmutation im Leptin-Rezeptor-Gen
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DM	Diabetes mellitus
DN	Diabetische Nephropathie
DNA	Desoxyribonucleic acid (engl.)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay (engl.)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HbA1c	Hämoglobin A1c
HRP	Horseradish peroxidase (engl.)
IgG	Immunglobulin G
IU	International Unit
kDa	Kilo-Dalton

kgKG	Kilogrammkörpergewicht
KI	Konfidenzintervall
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
M	Molar (mol/l)
MAU	Makroalbuminurie
MODY	maturity onset diabetes of the young (engl.)
NO	Stickstoffmonoxid
OPA	o-Phthaldialdehyd
PAS	Period acid-Schiff
PCR	Polymerase chain reaction (engl.)
RFU	Relative fluorescence units (engl.)
RNA	ribonucleic acid (engl.)
ROS	reactive oxygen species (engl.)
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate (engl.)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Theromphilus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered saline (engl.)
TGF- β	transforming growth factor beta (engl.)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit(s) = Enzymeinheit(en)
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America (engl.)
V_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Sättigung

1. EINLEITUNG

1.1 Diabetische Nephropathie

1.1.1 Allgemeines zum Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) ist ein Sammelbegriff für eine heterogene Gruppe metabolischer Erkrankungen, deren gemeinsame Pathologie die chronische Hyperglykämie darstellt. Die Ursache beruht auf einer gestörten Insulinsekretion oder Insulininteraktion oder einer Kombination aus beidem. Resultierend kommt es zu einem Ungleichgewicht des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinmetabolismus. Anhand der jeweiligen Ätiologie und Pathogenese wird der DM in verschiedene Untergruppen subklassifiziert.

Der Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) ist eine Erkrankung autoimmuner Genese, welche zu einem chronischen Untergang der insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas führt. Es kommt folglich zu einem absoluten Insulinmangel. Charakteristisch für die Gruppe der Typ 2 Diabetiker hingegen ist eine periphere Insulinresistenz und damit ein relativer Insulinmangel. Die anhaltend hyperglykämie Stoffwechsellage führt zu einer progredienten Dysfunktion der pankreatischen Zellen. Die Ursachen des Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM) sind vielfältig, häufig liegen Sekretionsdefekte sowie Resistenzen der Hormonrezeptoren, die zu einem Wirkungsverlust des Insulins führen, zu Grunde. Zwischen dem Auftreten der Insulinresistenz und der Manifestation des T2DM können mehrere Jahre bis Jahrzehnte liegen [1, 2]. Der Erkrankungsprozess wird multifaktoriell beeinflusst, so ist er häufig mit dem metabolischen Syndrom vergesellschaftet, aber auch Alter, Genetik und Umweltfaktoren stellen Risikofaktoren dar [3]. Während der T1DM mit 5 - 10 % und der T2DM mit 90 % den größten Anteil repräsentieren, sind weitere seltene Formen, wie zum Beispiel der Gestationsdiabetes, MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) oder Formen durch Erkrankungen des exokrinen Pankreas, zahlenmäßig unbedeutend und werden hier nicht näher besprochen [4].

Veränderte Lebensgewohnheiten und der demographische Wandel haben zu einem dramatischen Anstieg der globalen Prävalenz geführt. Einer von neun Erwachsenen, deutschen Bundesbürgern ist bereits an DM erkrankt und die nationale Prävalenz liegt bei über 11,5 %. Europaweit waren im Jahr 2015 bereits 59,8 Millionen Menschen in Europa betroffen und es ist abzusehen, dass die Zahl der Erkrankten bis im Jahr 2040 auf ca. 71,1 Millionen ansteigt [5].

Die Krankheit stellt auch eine zunehmende und unkontrollierbare Kostenproblematik für unser Sozial- und Gesundheitssystem dar. Die internationale Diabetes Gesellschaft beschreibt, dass 12 % der Weltgesundheitsausgaben dem DM zu Lasten fallen [6]. Ein deutscher Patient kostet das nationale Gesundheitssystem im Durchschnitt über 4500 Euro [7, 8]. Schwerwiegende Komplikationen, wie die terminale Niereninsuffizienz und die daraus folgende Notwendigkeit der Dialysebehandlung, beanspruchen hierbei die höchsten Kosten [9].

Von weltweit großem Interesse ist daher die Prävention und Therapie der Erkrankung und ihrer Folgeschäden. Die anhaltende hyperglykämie Stoffwechsellage führt langfristig zu

irreversiblen Schäden des Blutgefäß- und Nervensystems, welche sekundär zu Funktionseinschränkung und -verlust verschiedener Organe führen.

Strukturelle Schädigungen an Blutgefäßen werden in mikrovaskuläre und makrovaskuläre Prozesse eingeteilt. Zu den makrovaskulären Komplikationen gehören Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Als kausale Konsequenz der beschriebenen Gefäßveränderungen treten Gefäßkrankheiten und Arteriosklerose bei Diabetikern früher auf und schreiten schneller voran. Die Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind es schließlich auch, welche die Lebenserwartung von Diabetikern um durchschnittlich sieben Jahre verkürzen [10, 11]. Zu den häufigsten diabetischen Mikroangiopathien gehören die diabetische Nephropathie (DN), die diabetische Retinopathie und die autonome sowie sensorische und motorische, diabetische Neuropathie. Der Anteil des DM an allen Erblindungen in Deutschland liegt bei 10 % und stellt damit weiterhin die dritthäufigste Ursache dar [12]. Einheitliche epidemiologische Daten zur Prävalenz der diabetischen Neuropathie in Deutschland fehlen, was unter anderem an fehlenden einheitlichen Definitionen und Diagnosekriterien liegt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass etwa 30 % der Diabetiker an einer Neuropathie leiden. Typ 1 und Typ 2 Diabetiker sind dabei gleich häufig betroffen.

Eine der schwersten mikrovaskulären Folgeschäden ist die DN, an der nach zehnjährigem Krankheitsverlauf jeder vierte Diabetiker leidet. Die Progression einer manifesten DN führt innerhalb von 20 Jahren bei 75 % der Typ 1 Diabetiker und 20 % der Typ 2 Diabetiker zu einer terminalen Niereninsuffizienz mit der Notwendigkeit einer Dialysebehandlung [13].

Als protektiv, hinsichtlich der Progredienz einer DN, gilt eine normnahe Blutdruckeinstellung sowie eine Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [14]. Bei T2DM mit Mikroalbuminurie verhindern ACE-Hemmer [15] und Angiotensin-Rezeptorblocker [16] den Anstieg der Albuminausscheidung auch dann, wenn der Patient normotensiv ist, besonders jedoch wenn eine Hypertonie vorliegt. Eine frühzeitige, antihypertensive Therapie reduziert somit das kardiovaskuläre Risiko sowie die Gesamtmortalität [13]. Eine kurative Therapie existiert jedoch bis heute nicht und die DN bleibt die weltweit häufigste Ursache des terminalen Nierenversagens [17].

1.1.2 Pathogenese und Epidemiologie der diabetischen Nephropathie

Die DN ist eine Erkrankung der Nieren, die sich bei 20 - 40 % der Diabetiker als mikroangiopathische Komplikation entwickelt. Dabei steigt das Manifestationsrisiko einer DN mit der Dauer der Diabeteserkrankung an. Aufgrund der gestiegenen Lebenserwartung sowie der global zunehmenden Diabetesprävalenz stellt die DN demnach eine immer größer werdende Problematik unseres Gesundheitssystems dar [18-21].

Als beeinflussbare Risikofaktoren für das Auftreten und die beschleunigte Progredienz der DN gelten die arterielle Hypertonie, das Ausmaß der Albuminurie, die Güte der Diabeteseinstellung (HbA1c), Cholesterin- und Triglyzeridspiegel sowie allgemeine, kardivaskuläre Risikofaktoren wie Nikotinkonsum. Auch nicht-beeinflussbare Faktoren, wie eine genetische Komponente, konnten anhand von Zwillings- und Geschwisteranalysen, sowie ethnischer Häufung der Erkrankung nachgewiesen werden. Der Verlauf der DN wird insofern multifaktoriell beeinflusst und kann durch optimale Blutdruckeinstellung und konsequente Stoffwechselkontrolle positiv beeinflusst werden [19-23].

In allen industrialisierten Ländern kam es in den letzten Jahrzehnten zu einem dramatischen Anstieg der Häufigkeit der Niereninsuffizienz unter Diabetikern [17]. In Deutschland wurde vom nationalen Gesundheitsregister für das Jahr 2001 eine Inzidenz von 4 % dialysepflichtiger Typ-1- und 32 % dialysepflichtiger Typ-2-Diabetiker verzeichnet. Lokale Daten aus Heidelberg belegen, dass 49 % aller Patienten, die zur Nierenersatztherapie kommen, einen DM aufweisen. Im Raum Heidelberg werden demnach jährlich 98 Diabetiker pro Millionen Einwohner dialysepflichtig, dies ergäbe hochgerechnet auf Deutschland 8000 Patienten pro Jahr [24].

Insgesamt ist für Patienten mit DN das Risiko zu sterben höher, als jenes das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz zu erreichen [25]. Dennoch haben sich durch neue medizinische Behandlungskonzepte, effektive pharmakologische Fortschritte und verantwortungsbewussteres Gesundheitsverhalten in den letzten Jahrzehnten die Mortalitätszahlen für Diabetiker gebessert. Durch das verbesserte Gesamtüberleben steigt die Prävalenz dialysepflichtiger Diabetiker ebenso wie die Anzahl jener, die eine Nierentransplantation benötigen [26]. Die hochgerechnete Inzidenz einer Dialysebehandlung oder präemptiven Nierentransplantation von gesetzlichen Krankenversicherten mit DM von 2005 bis 2008 lag bei 158 Fällen pro 100 000 Personen/Jahr. Dies entspricht einem sechsfach erhöhten Risiko im Vergleich mit Personen ohne DM [27].

Die Entwicklung der DN folgt einem charakteristischen Verlauf mit strukturellen und funktionellen Veränderungen. Diese sind bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern vergleichbar. Das Auftreten einer Mikroalbuminurie (30-300 mg Albumin/g Kreatinin) stellt einen der frühesten, klinischen Marker dar und gilt als eine Vorstufe der DN. Der quantitative Nachweis sollte dabei durch den Albumin-Kreatinin-Quotienten (ACR) im ersten Morgenurin erfolgen. Es ist der häufig langen Latenz zwischen Manifestation und Diagnose des T2DM geschuldet, dass 7 % der Patienten bereits bei Erstdiagnose eine Mikroalbuminurie aufweisen [28, 29]. Nach einer mittleren Diabetesdauer von 8-19 Jahren steigt die Prävalenz der Mikroalbuminurie, je nach zugrunde liegenden diagnostischen Kriterien, bereits auf 17-34 % an [30]. Ohne adäquate Intervention manifestiert sich bei 80 % der mikroalbuminurischen Patienten, innerhalb der folgenden 10 bis 15 Jahre, eine Makroalbuminurie (MAU, > 300 mg Albumin/g Kreatinin), von denen wiederum die Hälfte innerhalb von 10 Jahren eine terminale Niereninsuffizienz entwickelt. Der fortschreitende Nierenfunktionsverlust kann diagnostisch mit Hilfe der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bestimmt werden [31, 32].

Histologisch kommt es bei der DN zu einer Trias aus progressiver Glomerulosklerose, Verdickung der glomerulären Basalmembran und diffuser mesangialer Expansion. Diese strukturellen Veränderungen führen bei den Patienten zu einer chronischen tubulointerstitiellen Schädigung [33]. Unter den pathogenen Mechanismen scheinen die hyperglykämisch induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Advanced Glycation Endproducts (AGE), wie auch die Aktivierung der Proteinkinase C, eine wichtige Rolle zu spielen [34-37]. Ebenso werden DNA-Methylierung und Histon-Modifikation als epigenetische Komponente diskutiert. Die genauen Prinzipien sind bis heute nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Forschung [38, 39].

In einer Biopsie können die morphologischen Veränderungen früh als eosinophile, PAS positive Glomerulosklerose dargestellt werden (Abb. 1.1), während sich die Patienten oft noch klinisch inapparent und normoalbuminurisch präsentieren. Als „Kimmelstein-Wilson-

Syndrom“ bezeichnet man dabei die noduläre Form der Glomerulosklerose. Sie ist nach ihren Erstbeschreibern Clifford Wilson und Paul Kimmelstein benannt und stellt das Endstadium der diabetischen Veränderungen am Glomerulus dar. Dabei führen Schäden der gefäßumkleidenden Podozytenfortsätze zu einer Störung der Barrierefunktion mit daraus resultierender erhöhter glomerulärer Permeabilität und folgender Albuminurie [18, 20, 21].

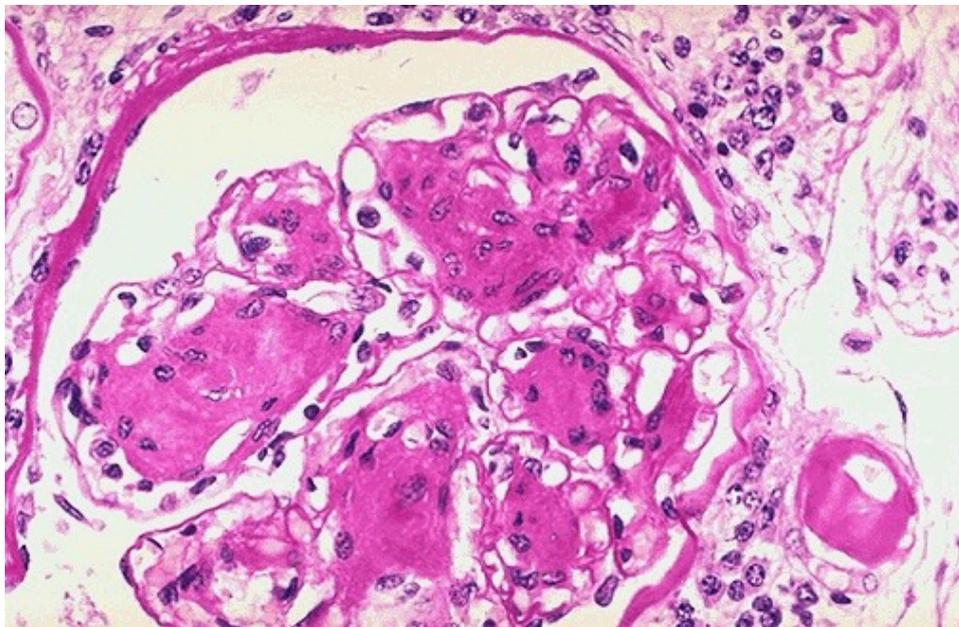


Abb. 1.1: Histopathologie der diabetischen Nephropathie. Darstellung eines hypertrophen Glomerulus in PAS Färbung. Deutlich erkennbar ist die mesangiale Expansion, die mit der verdickten Basalmembran die typische PAS positive, noduläre Kimmelstiel-Wilson Glomerulosklerose bildet. Vergrößerung 200fach. Quelle: The Internet Pathology Laboratory for Medical Education, Florida State University College of Medicine. <http://library.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENAL028.html>

Anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des Albumin-Kreatinin-Quotienten im Urin wird die DN in fünf Stadien eingeteilt (Abb. 1.2) [40].

Stadium/Beschreibung	glomeruläre Filtrationsrate (ml/min)	Albumin-Kreatinin-Quotient im Urin (mg/g)	Bemerkungen
Nierenschädigung mit normaler Nierenfunktion			S-Kreatinin im Normbereich
1a Mikroalbuminurie	> 90	♂ 20 – 200 mg Albumin/g Kreatinin ¹ ; ♀ 30 – 300 mg Albumin/g Kreatinin ¹	Blutdruck im Normbereich, steigend oder Hypertonie
1b Makroalbuminurie	> 90	♂ > 200 mg Albumin/g Kreatinin ¹ ; ♀ > 300 mg Albumin/g Kreatinin ¹	Dyslipidämie, raschere Progression von KHK, AVK, Retinopathie und Neuropathie
Nierenschädigung mit Niereninsuffizienz (NI)			S-Kreatinin grenzwertig oder erhöht, Hypertonie, Dyslipidämie, Hypoglykämieineigung, rasche Progression von KHK, AVK, Retinopathie u. Neuropathie. Anämie-Entwicklung, Störung des Knochenstoffwechsels
2 leichtgradige NI	60 – 89	♂ > 200 mg Albumin/g Kreatinin ² ; ♀ > 300 mg Albumin/g Kreatinin ²	
3 mäßiggradige NI	30 – 59	abnehmend	
4 hochgradige NI	15 – 29	abnehmend	
5 terminale NI	< 15		

¹ Bei Konzentrationsmessung ohne Bezug auf U-Kreatinin gilt: 20 – 200 mg/l.
² Bei Konzentrationsmessung ohne Bezug auf U-Kreatinin gilt: > 200 mg/l.

Abb. 1.2: Stadien der diabetischen Nephropathie und assoziierte Begleiterkrankungen. Quelle: [40]

Albuminurie und GFR korrelieren mit dem Ausmaß der Nierenschädigung und tragen damit entscheidend zur Morbidität und Mortalität der Patienten bei. Basierend auf aggregierten Daten von mehr als 1,5 Millionen Patienten aus mehreren großen Studien wurde in den internationalen Versorgungsleitlinien der KDIGO 2012 eine Risikostratifizierung in 18 Gruppen entwickelt. In Folge der ermittelten Risikoprofile ergeben sich, abhängig vom Stadium der Niereninsuffizienz, unterschiedliche Empfehlungen für Therapiemaßnahmen und diagnostische Kontrollintervalle sowie Prognosen für klinisch relevante Endpunkte (Abb. 1.3) [41]. Nationale Leitlinien empfehlen Diabetikern aufgrund dieser hohen Relevanz eine mindestens einmal jährliche Kontrolle der Nierenfunktionsparameter [19].

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories		
				Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Abb. 1.3: Prognose chronischer Nierenerkrankungen (CKD). „Heat map“ der KDIGO für Klassifikation und Diagnose chronischer Nierenerkrankungen basierend auf GFR und Ausmaß der Albuminurie. Quelle: [41].

Eine kausale Therapie der DN gibt es bislang nicht. Es sind langfristig multimodale Therapiekonzepte erstrebenswert. Neben der Lebensstilintervention (u.a. Nikotinkarenz und Förderung körperlicher Aktivität) sowie diätischen Maßnahmen (Reduktion von Übergewicht, Begrenzung der Protein- und Salzaufnahme) wird auch der medikamentösen Therapie eine wichtige Rolle zugeschrieben. Eine Behandlung der Dyslipidämie und eine Reduktion der Albuminurie durch Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit einem AT1-Blocker oder ACE-Hemmer können nachweislich die Progression der DN verlangsamen. Die zielgerichteten Therapieoptionen sind jedoch begrenzt. Die Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen könnte somit zu einem besseren Verständnis der Krankheit an sich und zur Entwicklung innovativer Substanzen mit therapeutischem Nutzen führen [19, 20, 42, 43].

1.2 L-Carnosin und Carnosinase

1.2.1 Eigenschaften von L-Carnosin

L-Carnosin ist ein Dipeptid, bestehend aus den Aminosäuren L-Histidin und β-Alanin, das 1900 erstmals von dem russischen Chemiker V.S. Gulewitsch beschrieben wurde und das

Substrat des Enzyms Carnosinase 1 [44, 45]. In Geweben mit hoher metabolischer Aktivität wie Skelettmuskel, Herz und Gehirn wird L-Carnosin von der ATP-abhängigen Carnosin-Synthetase (EC 6.3.2.11) gebildet [46-52]. Mit durchschnittlich 20 mmol/kg besitzt die Skelettmuskulatur die höchste Konzentration an L-Carnosin, die Menge ist dabei u.a. abhängig von Muskelfasertyp, Geschlecht, Alter und Ernährung. Niedrige Werte, unter 100 nM/ml, werden in Plasma und Liquor cerebrospinalis nachgewiesen [53-58]. Widersprüchlich ist die Literatur zum L-Carnosin Gehalt in der menschlichen Niere. Während Flanckbaum et al. in einer menschlichen Niere höhere Konzentrationen als in Herz, Magen oder Jejunum [59] fanden, konnten Jackson et al. kein L-Carnosin nachweisen [60]. Fitzpatrick et al. beschrieben L-Carnosin in der Niere von Ratten [61].

Über die Nahrung kann L-Carnosin u.a. in Form von Fleisch aufgenommen werden, besonders hohe Konzentrationen sind in Rind und Geflügel zu finden [62, 63]. Nach Absorption im jejunalen Abschnitt des Dünndarms wird das Molekül in den intestinalen Mukosazellen anteilig degradiert, dennoch lässt sich nach langfristiger oraler Zufuhr eine Zunahme des muskulären L-Carnosins nachweisen [64-67].

Bis heute ist die genaue biologische Rolle nicht endgültig verstanden, Forschungsergebnisse beschreiben jedoch eine Vielzahl heterogener Eigenschaften [49, 68-70]. Dazu gehören die antioxidative Wirkung als Radikalfänger reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [71-73], ein Schutz vor AGE-Toxizität durch Hemmung der AGE-Synthese [74-76] sowie die Funktion als Aldehydfänger im Rahmen der schädlichen Lipidperoxidation [72, 77, 78]. Auch revitalisierende Effekte werden in der Literatur diskutiert. Bei verschiedenen Zelllinien konnte, in Gegenwart von L-Carnosin, in vitro eine Verlängerung der Zellteilungszyklen mit Extension der Lebensspanne von 20-30 % beobachtet werden. Gallant et al. zeigten in vivo ergänzend bei beschleunigt alternden Mäusen (senescence accelerated mice, SAM) eine verlängerte Lebensspanne von 20 % nach Supplementierung des Trinkwassers mit L-Carnosin [79-84].

Ein weiterer positiver Effekt wird im Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel beobachtet. Unsere Arbeitsgruppe beschreibt eine signifikante Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage in einem T2DM Mausmodell mit db/db Tieren durch Supplementierung des Trinkwassers mit L-Carnosin. Die substituierten Tiere zeigten im Verlauf niedrigere Nüchtern-glukosespiegel und HbA1c-Werte sowie einen späteren Erkrankungsbeginn und milderen Verlauf des DM [85].

In vivo Experimente bei diabetischen Balb/cA-Mäusen konnten unter oraler L-Carnosinzufuhr (1 g/l) eine Zunahme des Insulinspiegels, bei gleichzeitig signifikanter Abnahme der Plasmaglukose, nachweisen [86].

Auch auf sekundäre diabetische Komplikationen wie die Entwicklung einer DN soll L-Carnosin eine protektive Wirkung haben [87]. An Streptozotocin-(STZ-)induzierten diabetischen Ratten untersuchten Riedl et al. renale Auswirkungen oraler L-Carnosineinnahme (1 g/kgKG/Tag). Neben einer Reduktion der in Folge der Hyperglykämie hochregulierten, pro-apoptotischen Faktoren Cytochrom c und Bax zeigte sich eine Verminderung der glomerulären Apoptoserate und des Podozytenverlustes [88]. Weiterhin moduliert L-Carnosin in Zellkulturen durch Inhibition der TGF- β -Produktion und des ALK5-Pathway die Akkumulation der extrazellulären Matrix in humanen Mesangiumzellen [89].

1.2.2 Humane Serum-Carnosinase

Carnosinasen gehören zu der enzymatischen Familie der Metalloproteasen. Es werden zwei Isoformen unterschieden, die Produkte unterschiedlicher Gene (CNDP1 und CNDP2) sind: die unspezifische zytosolische Gewebe-Carnosinase (CN2, EC 3.4.13.18) und die sekretorische humane Serum-Carnosinase (CN1, EC 3.4.13.20). Sie unterscheiden sich sowohl in ihrem Molekulargewicht als auch in ihren enzymatischen Eigenschaften [90, 91].

1949 isolierten Hanson und Smith erstmals CN2 aus Schweinenieren [92]. Die Dipeptidase besitzt eine relativ geringe Substratspezifität, hat ein Molekulargewicht von 53 kDa und lässt sich durch Betastatin hemmen. Aufgrund ihres Unvermögens Homocarnosin zu spalten, der niedrigen Affinität zu L-Carnosin und einem hohen pH-Optimum von 9,5 scheint sie für den Menschen verglichen mit der CN1 jedoch von geringfügiger Bedeutung zu sein [90, 91, 93, 94].

Im Zusammenhang mit einer Carnosinämie bei Kindern, einer seltenen autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselkrankheit, beschrieben Perry et al. 1968 erstmals die, auch sekretorische Carnosinase genannte, CN1. Pathologisch erhöhte L-Carnosinwerte im Blut und Serum der Patienten wiesen auf einen unbekanntem genetischen Defekt hin, der die CN1-Aktivität beeinflussen könnte [95]. CN1 hat ein Molekulargewicht von 57 kDa und ist ebenfalls eine Dipeptidase. Sie konnte bisher in Blutplasma und in wesentlich geringerer Aktivität und Konzentration in Liquor nachgewiesen werden [90, 96]. Exprimiert wird das CNDP1-Gen, das für die CN1 kodiert, vor allem im zentralen Nervensystem, aber auch in Niere und Leber konnte eine CN1-Synthese nachgewiesen werden [91, 97]. Ihr Vorkommen ist im Gegensatz zur ubiquitären CN2 auf Primaten beschränkt, einzige Ausnahme stellt dabei der syrische Goldhamster dar. Sonstigen Nagern fehlt ein Signalpeptid für die Sekretion, weshalb die CN1 im Zytosol verbleibt und weder in das Serum, noch in den Liquor sezerniert wird [94].

Die Substratspezifität der CN1 ist limitiert auf fünf verschiedene Xaa-Histidin-Dipeptide (Xaa = β -Alanin, N-Methyl- β -Alanin, Glycin und γ -Aminobuttersäure). Am höchsten ist die Enzymaktivität dabei für L-Carnosin (β -Alanin-L-Histidin, $K_m = 1,2 \text{ mM}$), gefolgt von Homocarnosin (γ -Aminobuttersäure-L-Histidin, $K_m = 200 \text{ }\mu\text{M}$) [91]. Während in Neugeborenen noch keine CN1-Aktivität nachgewiesen werden kann, unterscheidet sich diese unter adulten Individuen stark. Männer zeigen eine geringere Aktivität als Frauen. Everaert et al. beschrieben erstmals die Abhängigkeit des zirkulierenden L-Carnosinspiegels von der CN1-Aktivität. Nach oraler Zufuhr von 60 mg/kgKG ließ sich ein messbarer Anstieg des L-Carnosins ausschließlich in gesunden Probanden mit niedriger CN1-Aktivität nachweisen. Die Serum-CN1 wirkt somit einer Erhöhung des Substratspiegels entgegen und das zirkulierende L-Carnosin verhält sich umgekehrt proportional zur Enzymaktivität [57, 98, 99].

Ein Ungleichgewicht des Carnosin-CN1-Stoffwechsels ist mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert. Postuliert wurden Fälle neurologischer Defizite, wie Krämpfe und Lähmungen, bei Patienten mit geringer CN1-Aktivität [99-101]. Assoziationen sind auch mit seltenen Muskelerkrankungen und verschiedenen Pathologien des zentralen Nervensystems, wie der progressiven Demenz, beschrieben [95, 102-105]. Zu einem angeborenem CN1-Mangel im Serum führt die Carnosinämie, eine seltene Stoffwechselkrankheit. Das Krankheitsbild variiert von einem normalen Phänotyp bis zu

myoklonischen Anfällen mit psychomotorischer Retardierung und Hypertonie bereits in den ersten Lebensjahren. Bei einigen erkrankten Patienten ließ sich eine Punktmutation auf dem langen Arm von Chromosom 18q21.3 aufweisen [100, 106-110]. Bei Kindern mit Harnstoffzyklusdefekten, insbesondere dem x-chromosomal-rezessiven Ornithintranscarbamylase-Mangel (OTC-Mangel), stellte sich eine erhöhte renale Ausscheidung von L-Carnosin und eine nicht messbare Aktivität der CN1 heraus [111].

Auch die DN ist ein klinisch relevantes Beispiel einer Erkrankung mit veränderter CN1-Aktivität. Eine hohe Enzymaktivität der CN1 geht dabei mit einem erhöhten Risiko für DN einher [57, 99, 112].

1.2.3 Bedeutung der CN1 bei der diabetischen Nephropathie

Das Risiko an einer DN zu erkranken ist mit dem Polymorphismus eines Gens (CNDP1) auf Chromosom 18q22.3 assoziiert, das für die CN1 kodiert [87, 113]. Der Nachweis des determinierenden Gens basiert auf einer langjährigen Assoziationsstudie unter, von T2DM betroffenen, türkischen Familien. Dabei wurde der Locus zunächst auf Chromosom 18q22.3-23 zwischen den Genmarkern D18S43 und D18S50 identifiziert [113].

Janssen et al. gelang es 2005 schließlich in einer Fall-Kontroll-Studie unter Typ-2-Diabetikern aus Deutschland, den Niederlanden, Tschechien und Katar einen DNA-Polymorphismus auf dem Signalpeptid des CNDP1-Gens auf Exon 2 nachzuweisen. Das Signalpeptid selbst ermöglicht dem Molekül die zielgerichtete Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum und der CN1 schließlich die notwendige Sekretion in das Serum. Die Gene variieren hinsichtlich der Wiederholungsanzahl der CTG-Trinukleotide (CTG-Repeats) und kodieren für eine entsprechend unterschiedlich lange, hydrophobe Leucinkette in der N-terminalen Signalpeptidsequenz des CN1-Vorläuferpeptids [87]. Bestätigt wurde die Assoziation des Polymorphismus mit dem Inzidenzrisiko einer DN in diversen genetischen Kopplungsanalysen unter Typ-2-Diabetikern unabhängiger, ethnischer Gruppen [114-116]. Bei T1DM konnte hingegen keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden [87, 117-119].

Es werden mindestens fünf verschiedene CNDP1-Genotypen unterschieden, die entsprechend ihrer Anzahl an CTG-Repeats für vier, fünf, sechs, sieben oder acht Leucine im Signalpeptid kodieren [120]. Eine signifikante Korrelation zeigt sich zwischen der jeweiligen Genvariante und der Aktivität ihres Genproduktes, der CN1. Homozygote Träger des 5-Leucin-Allels (CTG₅) besitzen die geringste Enzymaktivität und das Risiko an einer DN zu erkranken erwies sich, verglichen mit allen anderen Genotypen, als 2,56fach geringer. Die einzelnen Genotypen beeinflussen demnach das Aktivitätslevel der CN1 und sekundär das potentielle Auftreten einer diabetischen Nephropathie [87, 116, 119, 121, 122]. Die beschriebene Homozygotie für das CTG₅-Allel (nach Herkunft des Trägers, der erstmalig mit dieser Allelkombination gefunden wurde, auch das „Carnosinase Mannheim Allel“ genannt) wird daher als protektiver Genotyp in Bezug auf das Auftreten einer DN gesehen [119]. Längere Leucin-Repeats zeigten eine höhere CN1-Aktivität (Abb. 1.4).

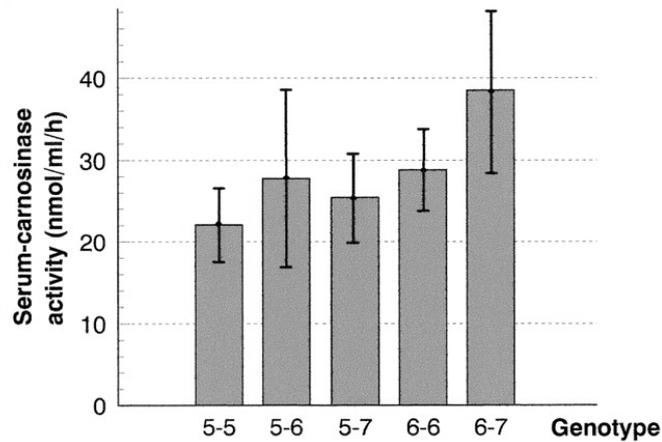


Abb. 1.4: Korrelation zwischen der CN1-Enzym-Aktivität und dem Genotyp. In 45 gesunden Individuen wurde der jeweilige Genotyp (Leucin-Repeat Länge) bestimmt und die CN1-Aktivität gemessen. Dargestellt ist die mittlere Enzym-Aktivität jedes Genotyps. Bei Homozygotie der 5-Leucin-Allele wurde die niedrigste CN1-Aktivität im Serum gemessen. Quelle: [87].

Der CTG-Polymorphismus könnte insofern eine „gain of function“ Mutation repräsentieren [87]. Gestützt wurde dieser Sachverhalt in einer in-vitro Analyse von Riedl et al. über den Einfluss des Polymorphismus auf die Sekretionsrate der CN1. In CN1-cDNA-transfizierten COS-7-Zellen zeigte sich dabei eine zunehmende Sekretion der CN1, bei steigender Anzahl der CTG-Repeats [120]. Auch Janssen et al. beschrieben niedrige Serum-CN1-Konzentrationen in Assoziation mit dem selteneren Auftreten einer DN bei Typ-2-Diabetikern mit der kürzesten Variante des CN1-Genotyps [87].

Die schützende Wirkung von L-Carnosin konnte in in vitro Experimenten an humanen Podozyten und Mesangialzellen nachgewiesen werden. In Gegenwart von L-Carnosin zeigte sich unter hohen Glukosekonzentrationen eine signifikante Reduktion mesangialer Akkumulation von Matrixbestandteilen, wie Kollagen IV und Fibronectin. Dieser protektive Einfluss auf die hyperglykämisch induzierte Matrixprotein-Akkumulation spricht für eine elementare Rolle bei der Entwicklung einer diffusen Glomerulosklerose [87]. Riedl et al. beschrieben weiterhin eine signifikant verminderte, mesangiale Produktion von TGF- β in Anwesenheit von L-Carnosin [89]. Das Zytokin TGF- β wird unter hohen Glukosekonzentrationen vermehrt synthetisiert und fungiert als potenter profibrotischer Faktor bei der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie [123]. Eine anhaltend hyperglykämische Stoffwechsellage wiederum reduziert die renale L-Carnosin-Konzentration [88]. Bestätigend beschrieben Peters et al. eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen gesteigerte CN1-Konzentration im Nierengewebe diabetischer Mäuse (db/db). Unter L-Carnosin Substitution zeigten sich die gemessenen CN1-Konzentrationen, sowie das Ausmaß einer bestehenden Glukosurie und HbA1c-Werte rückläufig [124].

Jüngst veröffentlichte Daten beschreiben, dass humane Glomeruli sowie Tubuluszellen Carnosinase-Synthetase und CN1 exprimieren und die Niere folglich einen eigenen Carnosin-CN1-Stoffwechsel reguliert [125, 126]. Besonders hohe CN1-Konzentrationen zeigen sich dabei in Tubuluszellen und Podozyten, niedrigere hingegen in den Endothelzellen. Divergent ist die exakte Lokalisation der CN1-Synthese innerhalb des Nephrons bei Gesunden und Typ-2-Diabetikern. Während CN1 in gesunden Nieren im distalen und proximalen Tubulus exprimiert wird, verlagert sich die Expression bei Diabetikern vor allem in das proximale

Tubulussegment. In renalem Gewebe mit DN konnte dabei eine signifikant höhere Syntheserate nachgewiesen werden [125].

1.3 Fragestellung

Die Literatur beschreibt für homozygote Träger des (CTG)₅-Allel im CNDP1-Gen eine geringere Suszeptibilität für die Entwicklung einer DN [113]. Eine verminderte CN1-Sekretion im Serum mit geringerer Enzymkonzentration sowie Enzymaktivität führen zu einem verminderten Abbau des Substrats L-Carnosin. Dem Dipeptid L-Carnosin werden antioxidative und renoprotektive Eigenschaften zugeschrieben [87], die möglicherweise durch den geringeren Abbau stärker entfaltet werden können.

Jüngste Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen paradoxerweise niedrigere Serum-CN1-Konzentration bei T2DM mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz, als bei Diabetikern mit erhaltender renaler Funktion und gleichem Genotyp [127]. Eine Hypothese dafür stellt der Verlust der CN1 über den Urin (Carnosinasurie, CNU) mit konsequenter Disparität des Carnosin-CN1-Stoffwechsels dar. Eine gestörte, glomeruläre Filtrationsbarriere bei zunehmender Nierenschädigung mit Proteinurie könnte, in Analogie zu Albuminurie, als Ursache für das Auftreten einer CNU fungieren. Ein Mangel an bisherigen Daten zum Auftreten von Carnosinase im Urin per se und der Etablierung eines validen Messverfahrens stellt die Grundlage dieser Arbeit dar.

Mittels verlässlichem Nachweisverfahren könnten Konzentrationsspektren bei T2DM und chronisch Nierenkranken nicht-diabetischer Genese (CKD) bestimmt werden, um das Ausmaß einer humanen CNU näher zu beschreiben. Korrelationen zu eGFR und Albuminurie könnten die Hypothese des Auftretens einer CNU bei defekter glomerulärer Filtrationsbarriere untermauern. Um die Rolle der CNU bei der DN und auf den Carnosin-CN1-Stoffwechsel besser zu verstehen, gilt es auch Assoziationen mit dem (CTG)_n-Polymorphismus bei Diabetikern zu eruieren.

Beschrieben wurde, dass auch humane Glomeruli und Tubuluszellen CN1 exprimieren und die Niere folglich über einen intrinsischen Carnosin-CN1-Stoffwechsel verfügt [125]. Es erschließt sich im Rahmen dieser Arbeit die Fragestellung, ob auch Nierengesunde CN1 im Urin aufweisen. Möglicherweise könnte es sich bei CNU demnach auch um einen physiologischen Vorgang handeln. Neben einem glomerulären Defekt im Rahmen einer Nephropathie wäre eine CNU demnach gegebenenfalls auch als gezielte renale Exkretion im Sinne der Aufrechterhaltung einer Carnosin-CN1-Homöostase zu betrachten.

Für die Pathogenese einer DN stellt auch der HbA_{1c} einen beeinflussbaren Risikofaktor dar [23]. L-Carnosin zeigt protektive Wirkungen auf diese und andere sekundären Komplikationen bei T2DM mit anhaltend hyperglykämischer Stoffwechsellage [87, 88]. Assoziationen zwischen dem Blutglukosestatus, L-Carnosin und CN1-Konzentrationen im Serum wurden in der Vergangenheit bereits beschrieben. Riedl et al. zeigten reduzierte L-Carnosinspiegel im hyperglykämischen Milieu [88] und Peters et al. wiesen eine erhöhte CN1-Konzentration im Serum diabetischer Mäusen nach [124]. Bei der Beschreibung der CNU und

deren Rolle für die DN wäre demnach auch ein möglicher, analoger Zusammenhang zwischen HbA1c, CNU und CN1-Konzentrationen im Serum bei Patienten mit T2DM aufschlußreich.

Bezugnehmend auf diese Tatsachen und die jüngsten Ergebnisse werden in dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

1. Kann CNU möglicherweise nicht nur bei T2DM und CKD, sondern auch bei gesunden Individuen detektiert werden?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen Nierenfunktionseinschränkung (eGFR) und CNU sowie Albuminurie bei T2DM und CKD?
3. Welchen Einfluss hat der (CTG)_n-Polymorphismus auf CNU?
4. Beeinflusst eine hyperglykämie Stoffwechsellage bei T2DM den CN1-Stoffwechsel im Serum sowie das Ausmaß einer CNU?

Teile dieser Arbeit sind bereits publiziert in *Amino Acids* 51: 17–25, 2019 mit folgenden Autoren und Titel: Rodriguez-Niño A, Gant CM, Braun JD, Li X, Zhang S, Albrecht T, Qiu J, Bakker SJL, Laverman GD, Krämer BK, Herold A, Hauske SJ, Yard BA. “Detection of carnosinase-1 in urine of healthy individuals and patients with type 2 diabetes: correlation with albuminuria and renal function” [128].

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

<i>Antikörper gegen</i>	<i>Funktion</i>	<i>Art</i>	<i>Spezies</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Produktnummer</i>
CN1	Catching Antibody	Polyklonal IgG	Ziege	R&D Systems (USA)	AF2489
CN1	Detecting Antibody	Polyklonal IgG	Kanninchen	ATLAS Antibodies (Schweden)	HPA008933
Goat-anti-Rabbit-IgG-HRP	Sekundärantikörper	Polyklonal IgG + HRP	Ziege	Santa Cruz (USA)	Sc-2030

2.1.2 Primer

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
5'-3' Vorwärtsprimer (6-FAM markiert)	FAM-GCGGGGAGGGTGAGGAGAA C	MWG-Biotec (Deutschland)
3'-5' Rückwärtsprimer	GGTAACAGACCTTCTTGAGG AATTTGG	MWG-Biotec (Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Milchpulver	Fluka (Schweiz)
Rekombinante humane CN1	R&D Systems, (Deutschland)
PM Blue POD Substrate	Roche Diagnostics (Deutschland)
Streptavidin-HRP	Vector Laboratories (USA)
Schwefelsäure 99,999 %, verdünnt auf 1 M	Sigma-Aldrich (USA)
L-Carnosin	Sigma-Aldrich (USA)
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich (USA)
L-Histidin	Merck Chemicals (Deutschland)
OPA	Sigma-Aldrich (USA)
TEMED	Sigma-Aldrich (USA)

Isopropanol	Merck Chemicals (Deutschland)
Ethanol 70 %	Sigma-Aldrich (USA)
TrisGlycerin SDS 10x	Biorad (USA)
Tween	Sigma-Aldrich (USA)
Methanol	Merck Chemicals (Deutschland)
Taq Polymerase	Promega (USA)
Taq Flexi Puffer 5x	Promega (USA)
Magnesiumchlorid (PCR)	Applied Biosystems (USA)
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Applied Biosystems (USA)

2.1.4 Lösungen und Puffer

<i>Puffer/Lösung</i>	<i>Bezugsquelle oder Rezept</i>
Tris Puffer 50 mM pH 7,5	Biorad (USA)
Tris Puffer 1,5 M pH 8,8	Biorad (USA)
PBS 10x	BAG Healthcare (Deutschland), 1:10 verdünnt in Aq. dest.
PBS/Tween	PBS, 0,2 % Tween
TBS	10x: 10 mM Tris Hcl, 150 mM NaCl, 1:10 in aqua dest. Verdünnen, pH 8
TBS/Tween	TBS, 0,1 % Tween
Acrylamidmix 40 %	Fluka (Schweiz)
SDS 10 %	Natriumdodecyl-Sulfat-Puffer: 100 mM Tris-HCl, 200 mM DTT, 4 % Natriumdodecyl-Sulfat/SDS, pH 6,8, 20 % Glycerol, 0,025 % Bromphenolblau
APS 10 %	Sigma-Aldrich (USA)
Lämmli Puffer	Biorad (USA)
Lämmli-Puffer mit β -Mercapto	950 μ l Lämmli-Puffer, 50 μ l β -Mercapto
Kammerpuffer	TrisGlycerin SDS 10x, 1:10 in aqua bidest
Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer (30,3 g Tris, 144,15 Glycerin, auf 1 l auffüllen), 150 ml Methanol, 750 ml Aq. dest.

2.1.5 Kits

<i>Kit</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Wizard Purifikation Kit	Promega GmbH (Deutschland)

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Eppendorf Safe-lock Tubes 0,5 / 1,5 / 2 ml	Eppendorf (Deutschland)
Einmalpipetten Falcon™ 1 / 2 / 5 / 10 / 25 ml	BD Biosciences (USA)
Falcon™ Tubes 15 / 50 ml	BD Biosciences (USA)
Combitips 0,5 / 2,5 / 5 ml	Eppendorf (Deutschland)
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen	Eppendorf (Deutschland)
ELISA 96 well Microplatte high binding	Greiner Bio-One (Deutschland)
Parafilm® M Verschlussfolie	Brand (Deutschland)

2.1.7 Geräte und Software

<i>Gerät / Software</i>	<i>Hersteller</i>
Pages OS X - Version 5.6.2	Apple Inc. (USA)
Microsoft Word 2008 für Mac – Version 12.3.2	Microsoft Corporation (USA)
Microsoft Excel 2008 für Mac – Version 12.3.2	Microsoft Corporation (USA)
Schüttler Vortex-Genie® 2	Scientific Industries (USA)
Schüttler Unimax 2010	Heidolph Instruments (Deutschland)
Pipetten Research	Eppendorf (Deutschland)
Multipipette plus	Eppendorf (Deutschland)
ELISA-Reader Bio-Kinetics EL312e	Bio-TEK Instruments (USA)
Microwin Software	Vitaris (Deutschland)
GeneQuant RNA/DNA Calculator	Biochrom Ltd. (England)

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenrekrutierung

Die Studie wurde unter dem Titel „Analyse von verschiedenen Aspekten des körpereigenen Enzyms CN1 bei Diabetikern und weiteren Patientengruppen im Zusammenhang mit diabetischer Nephropathie“ von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg genehmigt.

In den Jahren 2014 und 2015 wurden im Universitätsklinikum Mannheim etwa 2000 Patientenakten ambulanter und stationärer Patienten auf Eignung gescreent und ein Kollektiv von 129 Patienten rekrutiert. Ausschlusskriterien für die Teilnahme waren Minderjährige sowie Patienten nach Nierentransplantation.

Um der Fragestellung nachzugehen, ob CNU auch bei Nierengesunden auftritt, rekrutierten wir 25 Probanden in eine Kontrollgruppe. Alle rekrutierten Probanden unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung und wurden darüber in Kenntnis gesetzt, dass ein Anspruch auf Widerruf besteht. Hiervon machte ein Proband Gebrauch. Die Daten und Proben wurden pseudonymisiert.

Die Blutproben wurden morgens im Zuge der regulären Blutentnahme entnommen und, ebenso wie der abgegebene Spontanurin, sofort auf 8 °C gekühlt. Nach spätestens sechs Stunden wurde das Serum bei 4000 U/min zehn Minuten zentrifugiert. Serum und Urin wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C auf Eis gelagert.

Das Patientenkollektiv wurde in zwei Hauptgruppen eingeteilt: Patienten mit DM und nicht-diabetische Patienten. Einschlusskriterien für die diabetische Gruppe waren Typ 1 und 2 Diabetiker, deren Erkrankung gemäß den Kriterien der nationalen Versorgungsleitlinien durch einen $\text{HbA1c} \geq 6.5\%$ (≥ 48 mmol/mol) [129] oder anhand einer bekannten Anamnese definiert war. Die Gruppe der Nichtdiabetiker musste dementsprechend einen $\text{HbA1c} < 6.5\%$ (< 48 mmol/mol) und eine Anamnese ohne Diabetes in der Vorgeschichte aufweisen.

Zur Beurteilung einer Korrelation zwischen MAU und CNU wurden die zwei Hauptgruppen jeweils in Subgruppen unterteilt: Patienten mit MAU und jene ohne MAU. Mikroalbuminurische Patienten wurden demnach der Gruppe ohne MAU zugeteilt.

Bestimmt wurde der aktuelle Status der Nierenfunktionseinschränkung mittels geschätzter GFR gemäß Levey et al. (eGFR, Abb. 2.1) [130]. Das Ausmaß der Albuminurie wurde, analog der KDIGO definierten Albuminurie-Kategorien, anhand der Albumin-Kreatinin-Ratio beurteilt: Normal bis leicht erhöht ($\text{ACR} < 30$ mg/g), Mikroalbuminurie ($\text{ACR} 30\text{-}300$ mg/g) und MAU ($\text{ACR} > 300$ mg/g) [41]. Serum- und Urinproben gaben Aufschluss über den Blutzuckerstatus.

$$\text{GFR} = 141 \times \min(\text{SKr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{SKr}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{Alter}} \times 1,018 \text{ [bei Frauen]} \times 1,159 \text{ [bei schwarzer Hautfarbe]}$$

Abbildung 2.1: CKD-EPI-Formel zur Berechnung der geschätzten GFR (eGFR). GFR [ml/min/1.73m²], min = Minimum von SKr/κ und 1, max = Maximum von SKr/κ und 1, SKr = Serum-Kreatinin [mg/dl], κ = 0,7 (weiblich) bzw. 0,9 (männlich), α = -0,329 (weiblich) bzw. -0,411 (männlich), Alter = Lebensalter in Jahren [129].

2.2.2 CN1-Konzentration in Serum und Urin

Zum spezifischen Nachweis von CN1 im Urin kam ein enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) zur Anwendung. Kurz gefasst wurden für die Entwicklung eines humanen Carnosinase-1 ELISA, hochabsorbierende Mikrotiterplatten (Greiner BioChemia, Fracht, Deutschland) über Nacht mit 100 µl polyklonalem IgG CN1-Antikörper der Ziege beschichtet und bei 8 °C inkubiert. Die Platten wurden sorgfältig gewaschen und anschließend zur Verhinderung von unspezifischer Bindung mit 5 % (Gewicht/Volumen) Trockenmilchpulver inkubiert. Je Probe und Standard wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Die Platten wurden wiederum eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert und im Anschluss in drei Waschgängen mit PBS/Tween gründlich aufgereinigt. Ein polyklonaler anti-humaner CN1 Antikörper (ATLAS) wurde für eine Stunde aufgetragen und nachfolgend ausgewaschen. Meerrettich-Peroxidase konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper der Ziege wurde auf die Mikrotiterplatten aufgebracht und nach einstündiger Inkubation erfolgte ein weiterer Waschschriff. Zur Farbentwicklung wurde Peroxidase Substrat zugegeben und die Reaktion nach 15 Minuten mit 50 µl 1-molarer Schwefelsäure gestoppt. Sofort danach wurden die Platten mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und mit Microwin ausgewertet. Die CN1-Konzentrationen wurden nur im linearen Bereich der Verdünnungskurve bestimmt. Falls ein Wert außerhalb dieses Bereiches lag, wurde die Messung mit einer anderen Verdünnung wiederholt. Die Sensitivität des ATLAS-ELISA-Systems lag bei etwa 31 ng/ml.

2.2.3 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von CN1

Sofern nicht anders angegeben, wurde stets auf Eis gearbeitet. Zu Beginn wurden 62,5 µl L-Carnosin zu 250 µl der zu messenden Probe gegeben. Von diesem Ansatz wurden daraufhin sechs Eppendorf-Tubes mit je 40 µl der Mischung gefüllt.

Die einzelnen Eppendorf-Tubes wurden unterschiedlich lange (5', 15', 20', 30', 40') bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Probe 0' hingegen verblieb auf Eis gekühlt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Proben mit 10 µl Sulfosalicylsäure gefällt und auf einem Vortex durchmischt, bevor sie unverzüglich wieder auf Eis gekühlt wurden. Nach der Fällung der letzten Probe, wurden alle Tubes weitere 30 Minuten auf Eis gekühlt, um anschließend fünf Minuten raumtemperiert bei 13.000 U/min zentrifugiert zu werden.

Durch Verdünnung der Stammlösung in aqua-bidest wurde der Histidin Standard zu Konzentrationen von 0,075 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml und 0,010 mg/ml hergestellt. Je Probe und Inkubationszeit wurden 5 µl des Überstandes mit 5 µl aqua-bidest als Leerwert und 5 µl des Histidin Standards in ein Eppendorf-Tube gegeben. 150 µl einer Pufferlösung aus 1:1:1 Trichloressigsäure 1 %, OPA und Tris-Puffer wurden zu jedem Ansatz hinzugegeben

und 30 Minuten bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Unverzüglich nach Ende der Inkubationszeit wurden die Proben mit einem TECAN Fluorometer gemessen. Einzelne Parameter der Messung zeigt Tabelle 2.1.

<i>Parameter</i>	<i>Wert</i>
Messungsmodus	Fluoreszenz oben
Anregungswellenlänge	360 nm
Emissionswellenlänge	465 nm
Anzahl der Blitze	3
Verstärkung optimal	110
Verzögerungszeit	0 µs
Integrationszeit	40 µs
Gültige Temperatur	18-37 °C
Einheit	RFU

Tabelle 2.1: Parameter der Fluoreszenzspektroskopie

Mit Hilfe von Microsoft EXCEL wurde die Aktivitätsbestimmung im linearen Bereich des Zeit-Konzentrations-Diagrammes durchgeführt.

2.2.4 CNDP1 Genotypisierung

Aus EDTA-Vollblut wurde mit dem Wizard Genomic DNA Purification Kit protokollgemäß DNA isoliert.

Die Blutprobe wurde durch leichtes Rütteln weitgehend homogenisiert. 300 µl der Blutprobe wurden mit 900 µl Cell Lysis Solution des Kits in ein steriles 1,5 ml Tube gegeben und durch fünf- bis sechsfaches Invertieren gemischt. Um die Erythrozyten zu lysieren wurde die Mischung zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dabei zwei bis drei mal invertiert. Anschließend wurde die Mischung 20 Sekunden bei 15 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, ohne dabei das verbleibende weiße Pellet zu vermischen. Das Pellet wurde 10-15 Sekunden verwirbelt um es zu resuspendieren. 300 µl Nuclei Lysis Solution des Kits wurden anschließend hinzugegeben und durch fünf- bis sechsfaches Pipettieren vermischt.

Folgend wurde 300 µl Rnase Solution des Kits hinzugegeben und das Tube zwei- bis fünfmal invertiert. Die Mischung wurde bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert und danach auf Raumtemperatur abgekühlt.

100 µl Protein Precipitation Solution des Kits wurden dem Lysat hinzugefügt und durch vortexen 10 bis 20 Sekunden lang vermischt. Das Gemisch wurde im Anschluss drei Minuten bei 15 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml steriles Tube mit 300 µl Isopropanol überführt und durch vorsichtiges Invertieren vermischt, bevor dieses bei 15 g eine Minute zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde wiederum verworfen und 300 µl 70 % Ethanol hinzugegeben. Nach vorsichtigem Vermischen durch Invertieren wurde wieder eine Minute bei 15 g zentrifugiert. Vorsichtig wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet durch Invertieren auf sauberes, absorbierendes Papier gebracht. Das Pellet wurde im Anschluss 15 Minuten luftgetrocknet.

In das Tube wurden 100 µl Rehydration Solution gegeben und die DNA rehydriert, indem die Mischung eine Stunde lang bei 65 °C inkubiert wurde. Hierbei wurde die Probe mehrmals leicht gerüttelt um den Inhalt zu vermischen. Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei konstanten 4-8 °C.

Mit einem GeneQuant RNA/DNA Calculator (Biochrom Ltd., Cambridge, United Kingdom) wurde eine Konzentrationsmessung der isolierten DNA durchgeführt. Bei 260 nm und 280 nm wird hierbei die optische Dichte gemessen. Um eine Verunreinigung durch Protein- oder RNS-Reste auszuschließen, musste der Quotient aus den ermittelten Werten zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Für die eigentliche Genotypisierung wurde die isolierte DNA auf eine Konzentration von 5-10ng/ml verdünnt. Der Probenansatz für die anschließende PCR erfolgte gemäß Tabelle 2.2.

<i>Volumen</i>	<i>Bestandteil (Konzentration)</i>
5 µl	5x Taq Flexi Buffer
16,2 µl	Wasser für analytische Zwecke (HPLC H ₂ O)
1,5 µl	Magnesiumchlorid (MgCl ₂) (25 mM)
0,5 µl	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) (10mM)
0,3 µl	Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)
0,3 µl	Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
0,2 µl	Taq DNA Polymerase
1 µl	DNS (10 ng/µl)

Tabelle 2.2: PCR-Probenansätze für die Genotypisierung von CNDP1

Die PCR wurde mit 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation entsprechend Tabelle 2.3 bei vorgegebener Temperatur und Dauer durchgeführt.

<i>Schritte</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
1. Enzymaktivierung	94 °C	2 min
2. 25 Zyklen bestehend aus je:		
2.1. Denaturierung	94 °C	0,5 min
2.2. Hybridisierung	57 °C	0,5 min
2.3. Elongation	72 °C	0,5 min
3. Elongation	72 °C	5 min
4. PCR Ende	4 °C	

Tabelle 2.3: Ablauf der PCR mit vorgegebener Temperatur und Dauer der jeweiligen Schritte

Im Anschluss an die PCR wurden zu 1 µl des entstandenen PCR-Produktes 0,4 µl 350 ROX™ und 13,6 µl hochdesionisiertes Formamid zugefügt. Die Mischung wurde fünf Minuten bei 90 °C inkubiert, dann fünf Minuten auf Eis gekühlt und bis zur Fragmentlängenbestimmung maximal 24 Stunden bei 5 °C gelagert.

Mit dem ABI Prism DNS Analyzer 310 erfolgte die DNA-Fragmentlängenbestimmung des CN1 Trinukleotid Polymorphismus. Die Sequenzanalyse zeigte, dass das PCR Produkt mit 167 Basenpaaren fünf CTG-Repeats entsprach. Jede zusätzliche CTG Wiederholung verlängerte das PCR-Produkt insofern um drei weitere Basenpaare.

3. ERGEBNISSE

3.1 Nachweis von CN1 im Urin

Vorarbeiten beschreiben, dass die Konzentration humaner CN1 im Serum diabetischer Patienten signifikant mit der Nierenfunktion korreliert. Je ausgeprägter die Nierenfunktionseinschränkung, desto geringer war dabei die durchschnittliche CN1-Konzentration im Serum [127]. Ein möglicher Mechanismus für diese Tatsache könnte ein CN1-Verlust über den Urin aufgrund einer gestörten glomerulären Filtrationsbarriere bei zunehmender Nierenschädigung sein. Über die Ausscheidung der CN1 über den Urin ist bislang wenig bekannt. Die Beschreibung der CNU bei Patienten verschiedener Stadien der Nierenfunktionseinschränkung ist Grundlage dieser vorliegenden Doktorarbeit.

Unsere Arbeitsgruppe entwickelte ein ELISA-System, das mittels Sandwich-Technik definierte Konzentrationsspektren von CN1 in Serum oder Plasma nachweisen kann [131]. Dieses ELISA-System ist ebenfalls für die Messung von CN-1 im Urin geeignet [128]. Um der Fragestellung nachzugehen, ob CNU auch bei Nierengesunden auftritt und per se ein physiologisches Phänomen darstellt, wurde ein nierengesundes Kontrollkollektiv (n = 25) rekrutiert. Die Altersverteilung erstreckt sich von 21 bis 55 Jahren, der Anteil an Frauen ist im Verhältnis zu Männern höher (n = 17 vs. n = 8). Mittels ELISA-Technik wurde gemessen, ob und in welchem Ausmaß CN1 im Spontanurin nierengesunder Individuen detektierbar ist. Weiterhin wurde die Serum-CN1 Konzentration und der jeweilige CNDP1-Genotyp der Probanden bestimmt.

Gemäß der Fragestellung, welchen Einfluss der Genotyp auf eine mögliche CNU bei nierengesunden Probanden hat, wurde das Kollektiv in zwei Untergruppen unterteilt: Individuen, mit Homozygotie für die (CTG)₅-Variante des CNDP1-Gen bzw. insgesamt 10 Leucinen („Carnosinase-Mannheim-Allel“) und solche mit mindestens 11 Leucinen entsprechend 5L-6L oder mehr CTG-Repeats. Der prozentuale Anteil mit homozygoter (CTG)₅-Variante zeigt sich im nierengesunden Kollektiv bei Männern höher, als bei Frauen (37,5 % vs. 23,5 %). Bei 68 % der Probanden kann eine CNU nachgewiesen werden. Die CN1-Konzentrationen im Urin ist dabei signifikant geringer als die jeweiligen CN1-Konzentrationen im Serum (8,7 µg/ml vs. 57,6 ng/ml, p < 0,001). Träger des kurzen, homozygoten (CTG)₅-Allels zeigen signifikant niedrigere CN1-Konzentrationen im Serum verglichen mit anderen Varianten des CNDP1-Genotyps (5,7 µg/ml vs. 11,43 µg/ml, p < 0,05). Keine signifikante Korrelation kann zwischen dem (CTG)_n-Polymorphismus und der CNU-Konzentration festgestellt werden (Tab. 3.1).

	Gesamtkollektiv n = 25	5-5 CNDP1 Genotyp n = 7	andere CNDP1 Genotypen n = 18	p-Wert
Demographische Daten				
Geschlecht (männlich/ weiblich)	8/17	3/4	5/13	ns
Alter (in Jahren)	25 [21-55]	25 [21-49]	27,5 [22-55]	ns
Carnosinase Metabolismus				
CN1-Konz. in Serum (µg/ml)	8,7 [1,9-72,1]	5,7 [1,9-9,5]	11,43 [2-72,1]	< 0,05
CN1-Konz. in Urin (ng/ml)	57,6 [0-163,6]	98,7 [0-136,6]	56,41 [0-156,6]	ns
Carnosinasurie N(%)	17 (68,0)	5 (71,4)	12 (66,7)	ns

Tabelle 3.1: Kollektiv nierengesunder Probanden und CN1-Konzentration im Spontanurin. Unterteilung in zwei Gruppen gemäß CNDP1-Genotyp: Träger des homozygoten (CTG)₅-Allels (n = 7) und alle andere Genotypen (n = 18).

Die gemessenen CN1-Konzentrationen im Urin des gesunden Kontrollkollektivs zeigen Werte in einem Spektrum von 0 bis 163 ng/ml (Abb. 3.1).

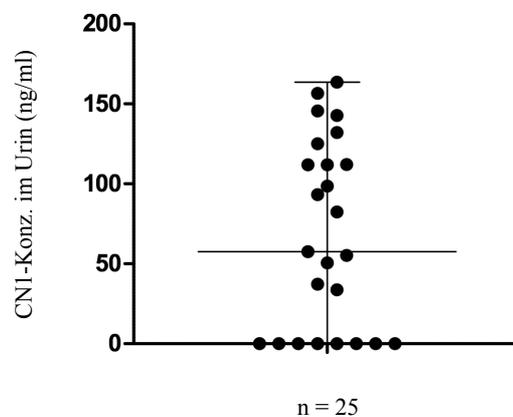


Abbildung 3.1: Detektion von Carnosinasurie bei Nierengesunden. Dargestellt sind mittels ELISA gemessene, CN1-Konzentrationen im Spontanurin 25 nierengesunder Probanden. Die Linien repräsentieren den Median sowie die Spannweite der Messwerte.

Die Gegenwart der CN1 im Urin wurde bei drei Probanden mit unterschiedlichen CN1-Konzentrationen durch Westernblotting bestätigt (Abb. 3.2).

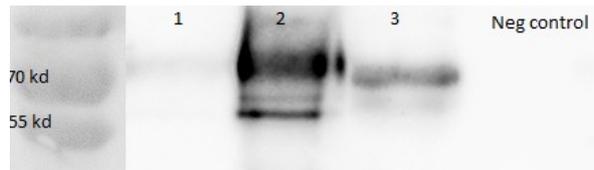


Abbildung 3.2: Bestätigung von Carnosinasurie bei Nierengesunden mittels Western Blot-Technik. Westernblotting des Urins dreier nierengesunder Probanden. Der Spontanurin wurde auf eine SDS-Page aufgetragen und anschließend mit einem spezifischen Antikörper gegen CN1 ein Immunblot durchgeführt. Die CN1-Konzentration wurde zuvor mittels ELISA bestimmt: niedrig (1), hoch (2) und mäßig (3). Eine spezifische Bande mit jeweils zu erwartender Ausprägung kann bei etwa 60 kDa nachgewiesen werden. Negativ Kontrolle: Urin einer nicht-transgenen Maus.

Als Vergleich wurden Urinproben von transgenen, CN1-exprimierenden Mäusen aufgetragen (Abb. 3.3).

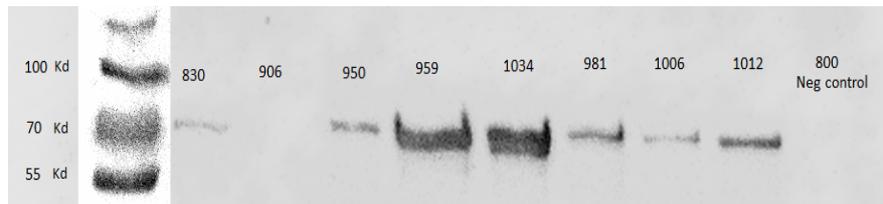


Abbildung 3.3: Detektion von CN1 im Urin mittels Western Blot-Technik. Vorbehandelter Urin von transgenen, CN1-exprimierenden Mäusen wurde auf eine SDS-Page aufgetragen und anschließend mit einem spezifischen Antikörper gegen CN1 ein Immunblot durchgeführt. Eine spezifische Bande kann bei etwa 60 kDa nachgewiesen werden. Negativ Kontrolle: Urin einer nicht-transgenen Maus.

3.2 CNU bei T2DM und CKD

Für diese Arbeit wurden Urin- und Serumproben (n = 128) von Typ 2 Diabetikern mit chronischer Nierenerkrankung (T2DM) und chronisch Nierenkranker nicht-diabetischer Genese (CKD) verglichen. Der Anteil an Diabetikern im Gesamtkollektiv ist mit 64 % höher als jener der CKD Patienten. Um die Hypothese einer Korrelation zwischen Ausmaß der CNU und einem Filtrationsdefekt auf glomerulärer Ebene zu stützen, wurden die beiden Hauptgruppen analog der definierten KDIGO-Kriterien [41] in Patienten mit und ohne MAU (ACR < 300 mg/g bzw. > 300 mg/g) substratifiziert. 17 der insgesamt 128 Patienten konnten aufgrund fehlender Messwerte der ACR keiner Subgruppe eindeutig zugewiesen werden und wurden von der Statistik ausgeschlossen.

Es erfolgte entsprechend eine Einteilung in die in Tabelle 3.2 aufgeführten Untergruppen.

Gesamtkollektiv n = 128				
T2DM ohne MAU n = 41	T2DM mit MAU n = 41	CKD ohne MAU n = 12	CKD mit MAU n = 17	Sonstige n = 17

Tabelle 3.2: Substratifizierung des Gesamtkollektivs. Unterteilung des rekrutierten Kollektivs, gemäß renaler Grunderkrankung und Albuminurie. T2DM = Typ 2 Diabetes, CKD = chronisch Nierenkranke nicht-diabetischer Genese, MAU = Makroalbuminurie, n = Anzahl.

Die Ergebnisse zeigen in beiden Hauptgruppen, T2DM und CKD, verhältnismäßig mehr Männer als Frauen (65,9 % bzw. 68,1 %). Diabetische Patienten sind im Mittel geringfügig älter (66,7 Jahre vs. 64,0 Jahre) und haben einen höheren BMI (30,4 kg/m² vs. 28,9 kg/m²), als jene Probanden der Gruppe chronisch Nierenkranker nicht-diabetischer Genese. Die häufigsten, renalen Grunderkrankungen der CKD-Gruppe sind die IgA-Nephropathie und die fokale segmentale Glomerulosklerose gefolgt von weiteren Glomerulonephritiden. Nur 14,4 % aller rekrutierten Patienten verfügen über eine eGFR größer als 60 ml/min/1,73m², 52,3 % weisen eine MAU auf. Dies beschreibt in der Gesamtheit eine Population mit bereits fortgeschritten eingeschränkter Nierenfunktion. Der prozentuale Anteil an Patienten mit MAU ist unter den Diabetikern gegenüber CKD niedriger (50,0 % vs. 58,6 %).

Das Patientenkollektiv T2DM mit MAU ist im Mittel jünger (62,4 Jahre vs. 71,0 Jahre) und zeigt eine signifikant schlechtere Nierenfunktion (21,1 ml/min/1,73m² vs. 36,1 ml/min/1,73m², $p < 0,05$), verglichen mit dem Patientenkollektiv T2DM ohne MAU. Wenn auch nicht signifikant, zeigen jene Diabetiker mit MAU außerdem geringere CN1-Serumkonzentrationen (10,2 µg/ml vs. 12,2 µg/ml) und erwartungsgemäß seltener das homozygote (CTG)₅-Allel im CNDP1-Gen (26,8 % vs. 33,1 %). Eine ähnliche Tendenz für die CN1-Konzentrationen im Serum und den CNDP1-Genotyp zeigt sich in der Gruppe CKD mit MAU gegenüber CKD ohne MAU (6,6 µl/ml vs. 10,0 µg/ml bzw. 17,6 % vs. 33,3 %).

In der Gruppe T2DM mit MAU kann bei 95,1 % eine CNU detektiert werden, bei normo- und mikroalbuminurischen Patienten liegt der Anteil bei 48,8 % ($p < 0,0001$). Die Konzentrationen für CNU sind dabei im Durchschnitt 5,6fach höher gegenüber dem gesunden Kontrollkollektiv (vgl. Tabelle 3.1). In der Gruppe CKD mit MAU zeigen alle makroalbuminurischen Patienten eine messbare CNU. Die prozentuale Verteilung für das Auftreten einer CNU ist in den Subgruppen mit und ohne MAU in den Kollektiven CKD und T2DM vergleichbar (100 % vs. 50 % bzw. 95,1 % vs. 48,8 %, $p < 0,0001$). Die Patienten T2DM mit MAU zeigen die höchste CN1-Konzentration im Urin (569,6 ng/ml) und die absoluten Werte sind etwa 6fach höher als jene in der Untergruppe T2DM ohne MAU (94,6 ng/ml, $p < 0,001$). Ähnliche Konzentrationsunterschiede für CNU zeigen sich in der Gruppe CKD mit und ohne MAU (461,1 ng/ml vs. 105,1 ng/ml, $p < 0,0001$).

Relevante demographische und klinische Daten des Kollektivs sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

	T2DM ACR < 300 mg/g n = 41	T2DM ACR > 300 mg/g n = 41	p-Wert	CKD ACR < 300 mg/g n = 12	CKD ACR > 300 mg/g n = 17	p-Wert
Demographische Daten	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
Geschlecht (männlich)	24 (58,5)	30 (73,2)	ns	10 (83,3)	9 (52,9)	ns
Alter (Jahre)	71 ± 2,0	62,4 ± 2,3	< 0,05	61,5 ± 6,0	65,8 ± 4,3	ns
Klinische Daten						
BMI (kg/m ²)	31,2 ± 1,2	29,7 ± 1,0	ns	28,9 ± 1,3	29,0 ± 1,6	ns
HbA1c (%)	8,1 ± 0,4	7,6 ± 0,3	ns	5,1 ± 0,2	5,3 ± 0,2	ns
Nierenfunktion						
Serum Kreatinin (mg/dl)	2,55 ± 0,3	4,65 ± 0,5	< 0,05	3,1 ± 0,6	4,4 ± 0,7	ns
eGFR (ml/min)	36,1 ± 4,2	21,1 ± 2,9	< 0,05	44,4 ± 11,8	25,7 ± 7,5	ns
• >60	8 (20)	2 (5)		4 (33)	2 (12)	
• 30 - 60	11 (27)	8 (19)		2 (17)	2 (12)	
• <30	22 (53)	31 (76)		6 (50)	13 (76)	
Albuminurie ACR (mg/g)	74,5 ± 11,9	2318 ± 352	< 0,0001	112,9 ± 24,4	1693 ± 369	< 0,0001
Carnosinase Metabolismus						
CN1-Konz. im Serum (µg/ml)	12,2 ± 3,5	10,2 ± 2,3	ns	10,0 ± 5,4	6,6 ± 2,7	ns
CN1-Konz. im Urin (ng/ml)	94,6 ± 28,9	569,6 ± 67,7	< 0,0001	105,1 ± 35,5	461,1 ± 116	< 0,0001
Carnosinasurie N(%)	20 (48,8)	39 (95,1)	< 0,0001	6 (50,0)	17 (100,0)	< 0,0001
5-5 CNDP1 Genotyp N(%)	14 (33,1)	11 (26,8)	ns	4 (33,3)	3 (17,6)	ns

Tabelle 3.3: Demographische und klinische Daten des nierenkranken Kollektivs. Einteilung in diabetische Patienten (T2DM) und nicht-diabetische Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung (CKD). Substratifiziert in Patienten mit und ohne Makroalbuminurie (ACR < 300 mg/g bzw. > 300 mg/g). Angabe der Daten: Mittelwert ± Standardabweichung, Median und Spannweite oder absolute Häufigkeit. ns: p < 0,05. T2DM: Typ 2 Diabetes, CKD: chronisch Nierenkranke nicht-diabetischer Genese, eGFR: geschätzte GFR mittels CKD-EPI Formel, ACR: Albumin-Kreatinin-Ratio, n: Anzahl.

Der Nachweis von CN1 im Urin mittels ELISA-System konnte durch Westernblotting bestätigt werden. Die Immunreaktion zeichnete eine markante Bande bei ~60 kDa ab. Um unspezifische Bindungen des CN1-Antikörpers an Albumin auszuschließen, entfernten wir bei zwei zufällig ausgewählten Proben mit enzymatisch aktiver PNGase die n-ständige Glykolisierung an CN1. Diese Intervention führte zu einer im Westernblotting deutlich sichtbaren Verringerung des Molekulargewichts des Proteins gegenüber dem korrespondierenden glykolysierten CN1-Molekül (Abb. 3.4).

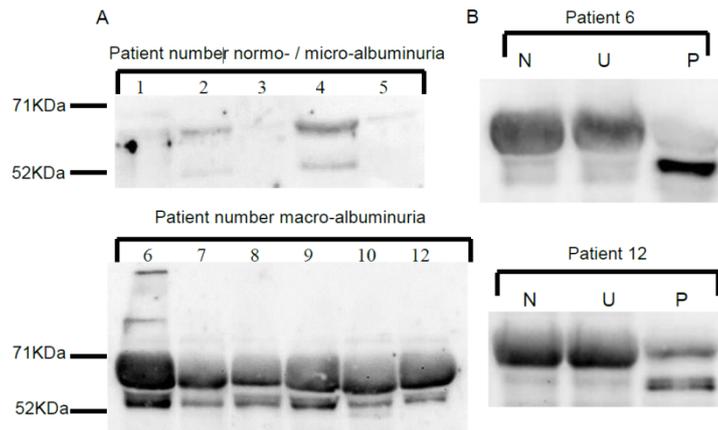


Abbildung 3.4: Nachweis von CN1 im Urin. (A) Westernblotting von CN1 im Urin. Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis von 12 Probanden. Banden 1-5: Patienten mit Normo- oder Mikroalbuminurie, Banden 6-12: Patienten mit MAU. (B) Dargestellt ist das Westernblotting der n-Glykolisierung zweier Urinproben mit PNGase. N: nativ, U: unbehandelt, P: nach enzymatischer Reaktion mit PNGase

3.3 Korrelationen zwischen CNU, Albuminurie und Nierenfunktion

Beiden Kollektiven mit MAU, sowohl T2DM als auch CKD, ist ein signifikant häufigeres Auftreten einer CNU gegenüber den jeweiligen Subgruppen ohne MAU gemein ($p < 0,0001$). Basierend auf diesen Ergebnissen und darauf, dass Patienten unabhängig von der zugrunde liegenden renalen Grunderkrankung mit MAU höhere Werte für CNU aufweisen, ist von einer bereits ausgeprägten Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere mit konsekutivem Verlust höherer CN1-Konzentrationen in den Urin auszugehen. Diese Hypothese lässt einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung, CNU und Albuminurie vermuten.

Wie in Abbildung 3.5 dargestellt, zeigen diabetische Patienten mit und ohne MAU absolut gemessen höhere Messwerte für CNU (569,6 ng/ml bzw. 94,6 ng/ml) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (57,6 ng/ml, $p < 0,001$ bzw. $p < 0,005$). In der Gruppe CKD zeigen sich signifikant höhere Werte für CNU in der Subgruppe mit MAU gegenüber Nierengesunden (461,1 ng/ml, $p < 0,005$).

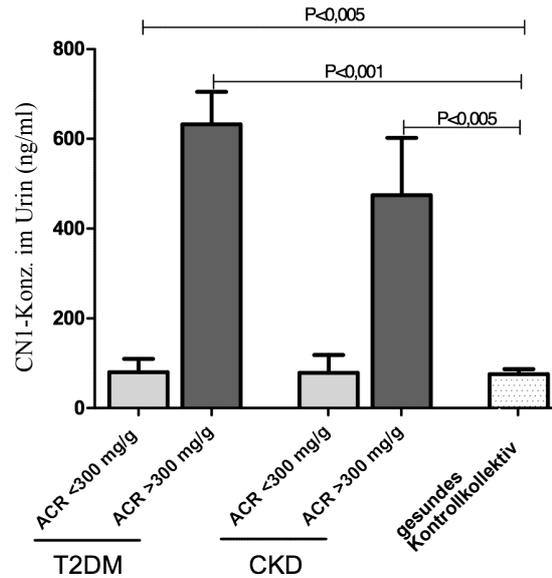


Abbildung 3.5: Ausmaß der CNU in unterschiedlichen Subgruppen. Vergleich der CN1-Konzentrationen im Urin bei diabetischen und nicht-diabetischen Probanden mit und ohne MAU, sowie gesunden Kontrollen.

Auch für die Gesamtheit des Patientenkollektivs, T2DM und CKD, kann eine signifikante, positive Korrelation zwischen CNU und ACR gezeigt werden ($r = 0,68$, $p < 0,0001$; Abb. 3.6).

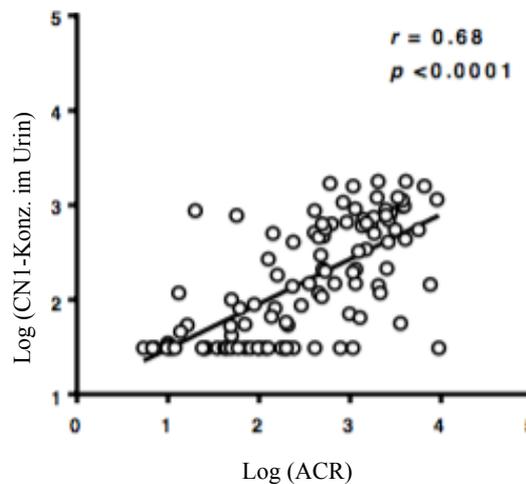


Abbildung 3.6: Korrelation zwischen CN1 im Urin und ACR. Gesamtkollektiv von 111 Patienten (T2DM und CKD), Rangkorrelation nach Spearman.

Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied für Serum-CN1-Konzentrationen und dem Ausmaß einer bestehenden Albuminurie. Das gesamte Patientenkollektiv, T2DM und CKD, wurde gemäß ACR in Untergruppen mit Normo-, Mikro- und Makroalbuminurie (ACR < 30 mg/g, 30-300 mg/g und > 300 mg/g) stratifiziert. Die absolut gemessenen niedrigsten Serum-CN1 Werte zeigen sich für Normoalbuminurie (11,2 µg/g), mikro- und makroalbuminurische Patienten zeigen untereinander vergleichbare Spiegel (26,3 µg/g vs. 24,1 µg/g; Abb. 3.7).

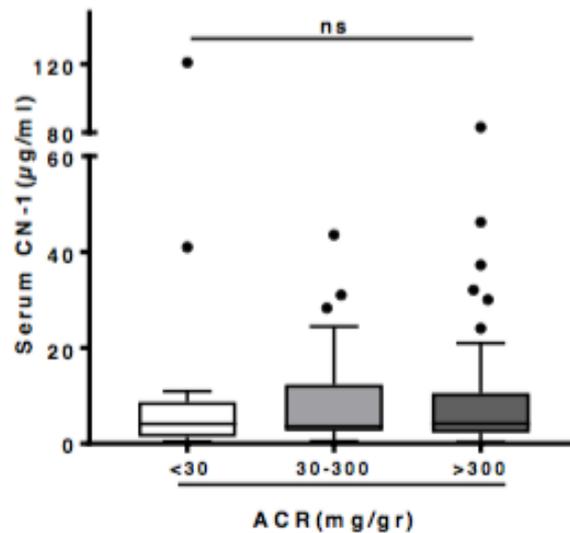


Abbildung 3.7: CN1-Konzentrationen im Serum gemäß ACR. Ein Kollektiv von 111 Probanden, davon 82 Typ-2-Diabetiker und 29 Probanden mit chronischer Nierenerkrankung nicht-diabetischer Genese wurden gemäß ACR stratifiziert. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte der Serum-CN1-Konzentration, der Median sowie das Streuungsmaß der verschiedenen Untergruppen.

Der Annahme, dass eine zunehmende Nierenschädigung mit fortschreitendem Defekt der glomerulären Permeabilität zu einem progredienten Verlust von CN1 in den Urin führt, folgt die Fragestellung ob hohe Konzentrationen von CN1 im Urin mit niedrigen Werten für CN1 im Serum assoziiert sind. Die Ergebnisse zeigen eine schwach positive Korrelation zwischen Serum-CN1-Konzentration und CNU für die Gesamtheit des Patientenkollektivs T2DM und CKD ($r = 0,22$, $p = 0,02$; Abb. 3.8).

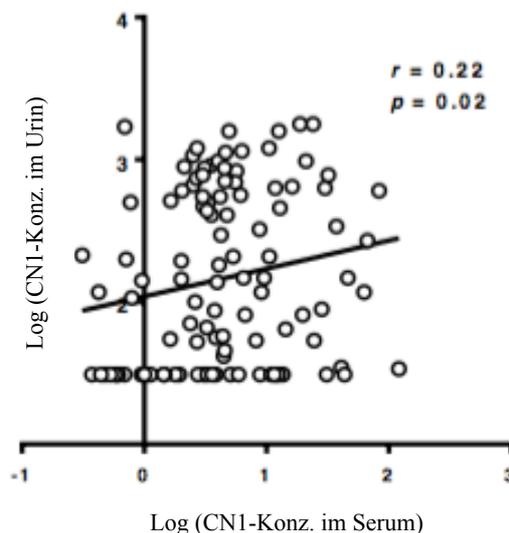


Abbildung 3.8: CN1-Konzentrationen in Serum und Urin. Gesamtkollektiv von 111 Patienten (T2DM und CKD), Rangkorrelation nach Spearman.

Eine signifikant höhere Serum-CN1 Konzentration zeigt sich bei der gesunden Kontrollgruppe im Vergleich zum gesamten Patientenkollektiv T2DM und CKD ($9,4 \mu\text{g/ml}$ vs. $4,1 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,0013$; Abb. 3.9).

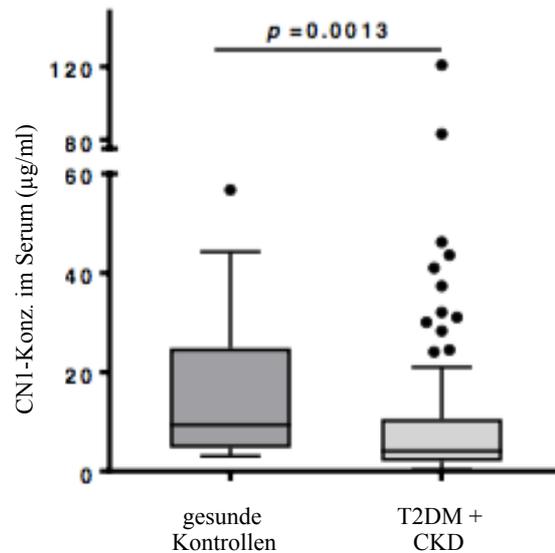


Abbildung 3.9: Serum-CN1-Konzentrationen. Gesunde Kontrollgruppe und gesamtes Patientenkollektiv (T2DM und CKD). Dargestellt sind die einzelnen Messwerte der Serum-CN1-Konzentration, der Median sowie das Streuungsmaß der beiden Kollektive.

Zusammenhänge zwischen Albuminurie und eGFR wurden vielfach beschrieben [28, 29, 32, 33], auch diese Ergebnisse weisen für T2DM und CKD eine negative Korrelation zwischen ACR und eGFR auf (Daten nicht dargestellt, $p < 0,05$). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen niedrige Serum-CN1-Konzentrationen bei fortgeschrittener Einschränkung der Nierenfunktion [127]. Keine publizierten Daten gibt es jedoch bislang zu CNU und Nierenfunktion. Die vorliegenden Ergebnisse beschreiben für die Subgruppe T2DM und CKD mit einer stark eingeschränkten renalen Funktion ($eGFR < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$) absolut gemessen die höchsten Werte für CNU (114,2 ng/ml). Mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ werden in der Subgruppe mit gut erhaltener eGFR ($> 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) deutlich niedrigere Konzentrationen für CNU gemessen (16,3 ng/ml). Patienten mit einer eGFR von 30 bis 60 ml/min zeigen ähnlich hohe Werte (105,6 ng/ml) wie die Subgruppe mit einer eGFR $< 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$ (Abb. 3.10).

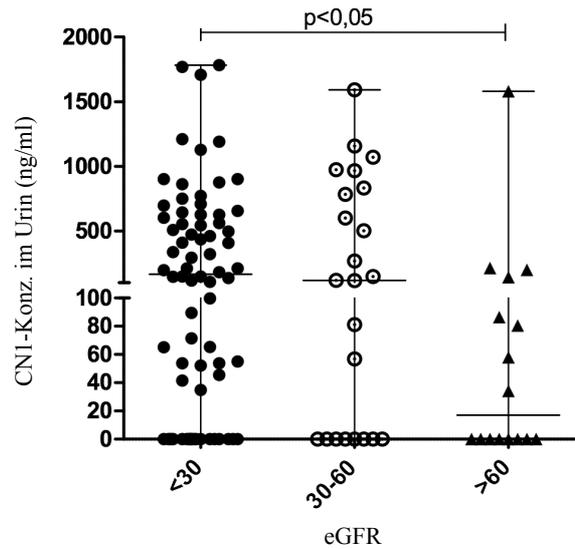


Abbildung 3.10: CN1-Konzentrationen im Urin gemäß eGFR. Ein Kollektiv von 111 Probanden, davon 82 Typ-2-Diabetiker und 29 Probanden mit chronischer Nierenerkrankung nicht-diabetischer Genese wurden gemäß GFR stratifiziert. Geschätzte GFR (eGFR in ml/min/1,73m²) mittels CKD-EPI-Formel. Dargestellt sind die individuellen Messwerte, der Median und das Streuungsmaß der jeweiligen Subgruppen.

Abbildung 3.11 zeigt, wenn auch ohne Signifikanz, gegensätzliche Verhältnisse für die CN1-Konzentrationen im Serum der nach eGFR stratifizierten Subgruppen des Patientenkollektivs T2DM und CKD. Absolut gemessen weisen Patienten mit einer eGFR < 30 ml/min/1,73m² die niedrigsten Werte für CN1 im Serum auf (8,2 µg/ml). Bei Patienten mit gut erhaltener Nierenfunktion (eGFR > 60 ml/min/1,73m²) und für die intermediäre Subgruppe mit einer eGFR von 30 bis 60 ml/min/1,73m² werden höhere CN1-Konzentrationen im Serum gemessen (14,8 µg/ml bzw. 12,4 µg/ml).

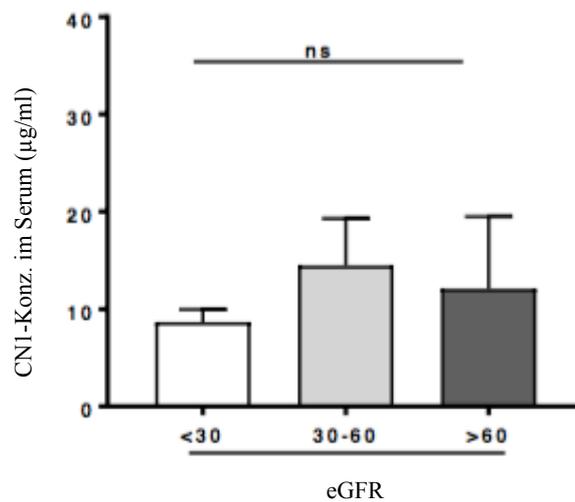


Abbildung 3.11: Serum CN1-Konzentrationen gemäß eGFR. Ein Kollektiv von 111 Probanden, davon 82 Typ-2-Diabetiker und 29 Probanden mit chronischer Nierenerkrankung nicht-diabetischer Genese wurden gemäß GFR stratifiziert. Geschätzte GFR (eGFR in ml/min/1,73m²) mittels CKD-EPI-Formel. Dargestellt sind der Median und das Streuungsmaß der jeweiligen Subgruppen.

3.4 CNU und der (CTG)_n-Polymorphismus

Homozygotie für das 5-Leucin-Allel im CNDP1-Gen („Carnosinase Mannheim Allel“) ist als protektiver Genotyp für die Entwicklung einer DN mit niedriger CN1-Konzentration im Serum beschrieben [87]. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im diabetischen Kollektiv einen entsprechenden Zusammenhang zwischen dem CNDP1-Genotyp und der CN1-Konzentration im Serum. Diabetische Probanden mit der (CTG)₅-Variante des Gens weisen im Serum niedrigere CN1-Konzentrationen auf als solche mit einer Genvariante mit 11 oder mehr Leucinen (7,3 µg/dl vs. 9,4 µg/dl), wenn auch bei kleinem Kollektiv nicht signifikant. Ähnliche Verhältnisse lassen sich für CNU beschreiben, Patienten mit der kurzen (CTG)₅-Genvariante zeigen auch im Urin niedrigere CN1-Konzentrationen (284,2 ng/ml vs. 362,8 ng/ml, Abb. 3.12).

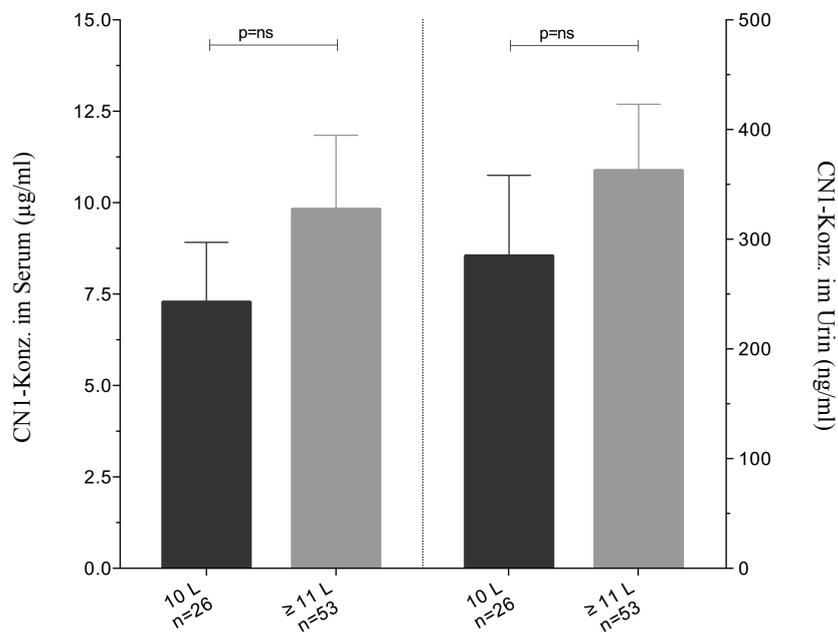


Abbildung 3.12: CN1-Konzentrationen im Serum und Carnosinasurie bei Diabetikern gemäß CNDP1-Genotyp. Kollektiv T2DM, linke Spalte CN1-Konzentration im Serum, rechts CN1-Konzentration im Urin. Stratifiziert in Patienten mit 10 Leucinen, entsprechend (CTG)₅-Variante des CNDP1-Genotyp bzw. „Carnosinase-Mannheim-Allel“ und ≥ 11 Leucine.

Um in diesem Zusammenhang den Einfluss einer beschädigten, glomerulären Filtrationsbarriere genauer zu beurteilen, stratifizierten wir die Ergebnisse gemäß dem Auftreten einer MAU. Probanden mit T2DM ohne MAU zeigen mit der (CTG)₅-Genvariante absolut gemessen niedrigere Messwerte für CNU (71,3 ng/dl), verglichen mit den anderen Genvarianten (113,8 ng/dl). Im Kollektiv T2DM mit MAU zeigen sich für die CNU-Konzentrationen nur geringfügige Unterschiede unter den verschiedenen Genotypen (10 Leucine 554,3 ng/dl vs. ≥ 11 Leucine 572,1 ng/dl; Abb. 3.13).

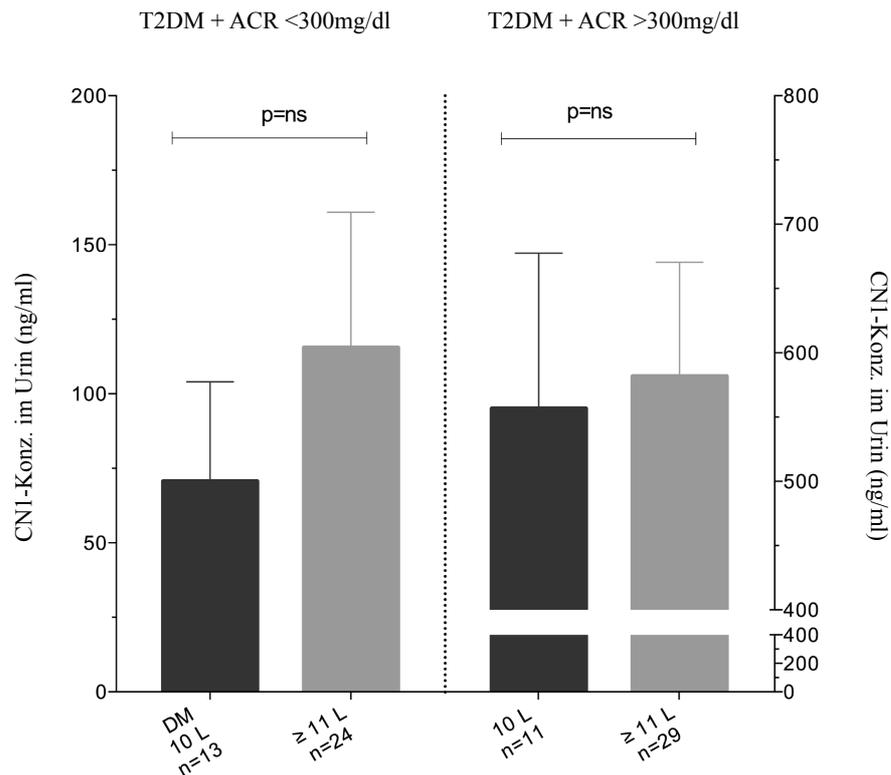


Abbildung 3.13: CNU gemäß CNDP1-Genotyp in Abhängigkeit von MAU. Kollektiv T2DM, linke Spalte ohne MAU, rechts mit MAU. Stratifiziert in Patienten mit 10 Leucinen, entsprechend (CTG)₅-Variante des CNDP1-Genotyp bzw. „Carnosinase-Mannheim-Allel“ und ≥ 11 Leucine.

Die Ergebnisse beschreiben in Konkordanz zu Vorarbeiten [57] für Männer mit T2DM eine selteneres Vorliegen des protektiven CNDP1-Genotypen gegenüber Frauen (39 % vs. 73 %). Die CN1-Konzentrationen in Serum und Urin des weiblichen T2DM Kollektivs zeigen jeweils niedrigere Messwerte gegenüber Männern. Beide Geschlechter weisen mit dem homozygoten CNDP1-Gen mit 10 Leucinen niedrigere CN1-Konzentrationen im Serum im Vergleich zu den jeweiligen Genvarianten mit ≥ 11 Leucinen auf (7,9 $\mu\text{g/ml}$ vs. 8,4 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 6,1 $\mu\text{g/ml}$ vs. 7,2 $\mu\text{g/ml}$; Abb. 3.14).

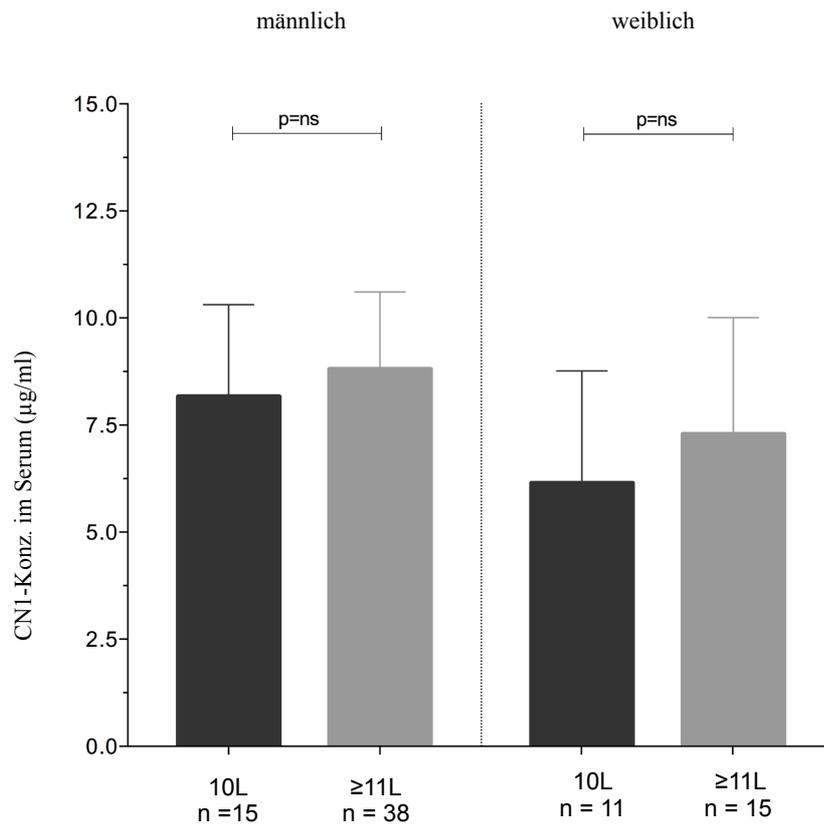


Abbildung 3.14: CNU gemäß CNDP1-Genotyp in Abhängigkeit des Geschlechts. Kollektiv T2DM, linke Spalte männlich, rechte Spalte weiblich. Stratifiziert in Patienten mit 10 Leucinen, entsprechend (CTG)₅-Variante des CNDP1-Genotyp bzw. „Carnosinase-Mannheim-Allel“ und ≥ 11 Leucine.

3.5 CNU und Hyperglykämie

Es ist beschrieben, dass der CN1-Metabolismus außer durch den CTG_(n)-Genotyp auch durch den Glukosestatus beeinflusst wird. Eine hyperglykämie Stoffwechsellage erhöht demnach die CN1-Konzentration im Serum von Mäusen [124]. Unsere Daten stützen diese Ergebnisse und zeigen eine positive Korrelation ($r = 0,87$, $p = 0,01$) zwischen dem gemessenen HbA1c und der CN1-Konzentration im Serum (Abb. 3.15).

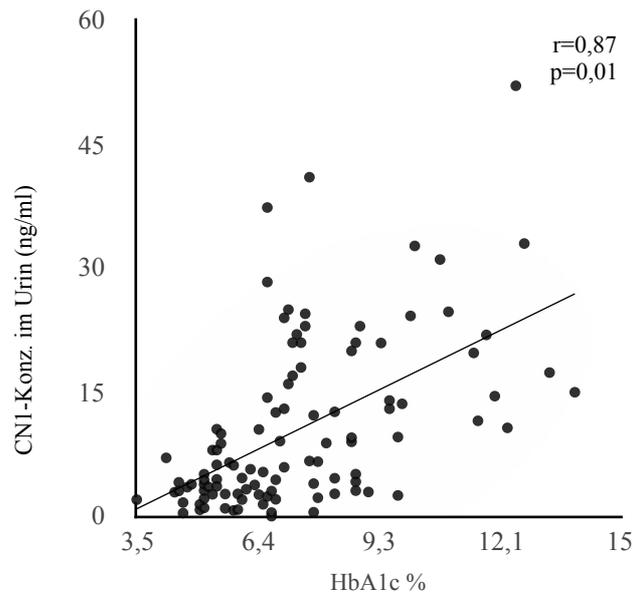


Abbildung 3.15: CN1-Konzentrationen im Serum und HbA1c. Dargestellt sind die Messwerte der CN1 im Serum in Abhängigkeit des HbA1c. Kollektiv CKD und T2DM. Es zeigt sich ein positiver linearer Zusammenhang.

Bisher gab es keine Daten die CNU in Abhängigkeit einer hyperglykämischen Stoffwechsellaage beschreiben. Unsere Daten zeigen keine Korrelation ($r = 0,02$, $p = 0,29$) zwischen dem gemessenen HbA1c und der CNU-Konzentration für das Kollektiv CKD und T2DM (Abb. 3.16).

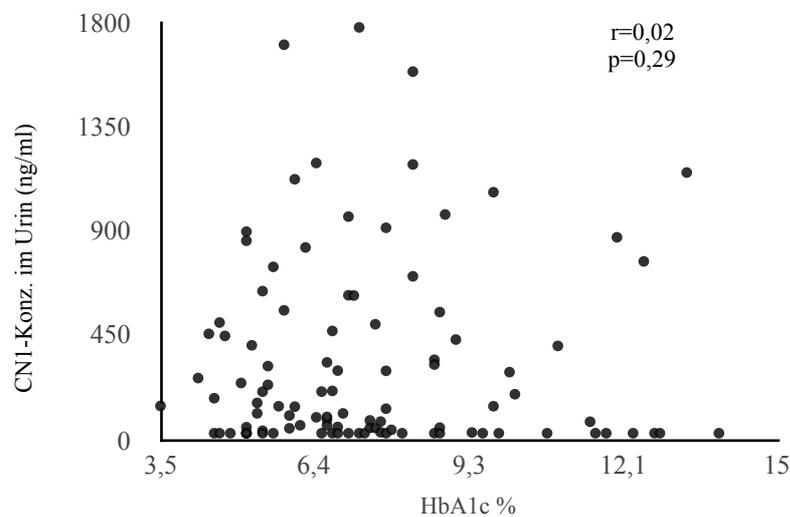


Abbildung 3.16: CN1-Konzentrationen im Urin und HbA1c. Dargestellt sind die Messwerte der CN1 im Urin in Abhängigkeit des HbA1c. Kollektiv CKD und T2DM. Es zeigt sich keine nachweisbare Korrelation der Messwerte.

4. DISKUSSION

Eine Assoziation des CNDP1 Genlocus und der Suszeptibilität für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie wurde in der Vergangenheit vielfach beschrieben. Eine niedrige Serumkonzentration und Enzymaktivität der CN1 weisen dabei protektive Eigenschaften gegenüber der Entwicklung einer DN auf [87, 116]. Aufgrund analoger, enzymatischer Eigenschaften wurde homozygoten Trägern des (CTG)₅-Allels im CNDP1-Gen eine geringere Suszeptibilität für die DN zugeschrieben. Anzumerken ist, dass andere Studien diesen Zusammenhang für unterschiedliche Ethnien nicht zeigen konnten [132, 133]. Aktuelle Daten unserer Arbeitsgruppe beschreiben, dass Typ-2-Diabetiker mit DN und fortgeschritten eingeschränkter Nierenfunktion signifikant niedrigere CN1-Konzentrationen im Serum aufweisen, als Patienten mit DN und erhaltener Nierenfunktion [127]. Die Hypothese einer defekten glomerulären Filtrationsbarriere mit konsekutivem CN1-Verlust über den Urin, bei zunehmender renaler Schädigung im Rahmen der Grunderkrankung, ist Grundlage dieser Arbeit.

Die vorliegenden Ergebnisse beschreiben erstmals, dass CN1 im Urin vorfindlich ist und mittels eines entwickelten ELISA-Systems nachgewiesen werden kann. Dabei konnte CN1 nicht nur bei den rekrutierten Probanden mit renaler Vorerkrankung detektiert werden, sondern auch in geringeren Konzentrationen bei einer gesunden Kontrollgruppe. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind zusammengefasst folgende:

1. CNU ist in unterschiedlicher Ausprägung sowohl bei gesunden Individuen als auch bei chronisch, nierenkranken Patienten diabetischer und nicht-diabetischer Genese nachweisbar. Die gemessenen CNU-Konzentrationen sind bei Patienten mit renaler Grunderkrankung im Durchschnitt 5,6fach höher als bei dem gesunden Kontrollkollektiv.
2. CNU ist bei Patienten mit MAU häufiger und höher konzentriert nachweisbar, verglichen mit Patienten ohne MAU.
3. Es besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen CNU und ACR ($p < 0,0001$, $r = 0,68$).
4. Patienten mit fortgeschrittener Nierenfunktionseinschränkung ($eGFR < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$) zeigen höhere CNU-Konzentrationen gegenüber Patienten mit erhaltener Nierenfunktion.
5. Eine signifikant positive Korrelation zwischen der CN1-Konzentration im Serum und CNU zeigt sich für die Gesamtheit des Patientenkollektivs T2DM und CKD. Dieser Zusammenhang könnte im Rahmen eines Permeabilitätsdefektes für eine freie Filtration in den Urin sprechen.

In Konkordanz zu den rezenten Vorarbeiten von Zhang et al. [127] zeigen auch die Ergebnisse dieser Arbeit bei Patienten mit stark fortgeschrittenem Nierenfunktionsverlust ($eGFR < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$) absolut gemessen niedrigere CN1-Konzentrationen im Serum gegenüber Probanden mit moderat oder gut erhaltener Nierenfunktion ($eGFR 30-60$ und $> 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$). Eine Ursache für die nicht vorhandene statistische Signifikanz könnte der niedrigere Anteil an Diabetikern und dialysepflichtigen Patienten dieser Arbeit sein. Während in der Vorarbeit insgesamt 127 Diabetiker eingeschlossen wurden, mit einem Anteil an dialysierenden von 76 %, liegt die Anzahl an Diabetikern für diese Arbeit bei 83 Probanden, davon nur 36 % mit Nierenersatztherapie. Dialyse per se und die metabolische Azidose als

häufige Komorbidität fördern einen verstärkten Proteinzerfall sowie die Oxidation von Aminosäuren und könnten die Detektion von CN1 beeinflussen [134, 135].

Die Hypothese eines renalen Verlusts der CN1 bei bestehender Nephropathie wird im Rahmen dieser Arbeit durch die Tatsache gestützt, dass die höchsten CN1-Konzentrationen im Serum des nierengesunden Kontrollkollektivs und bei Patienten mit einer eGFR > 60 ml/min/1,73m² gemessen werden. Dies beschreibt höhere Serum-CN1-Konzentrationen in Assoziation mit einer erhaltenen, renalen Filtrationsfunktion. Auch die statistisch signifikante Differenz der hohen Serum-CN1-Konzentrationen der gesunden Kontrollgruppe gegenüber der gesamten Patientenkohorte untermauert die Annahme zusätzlich.

Weiterhin zeigen die vorliegenden Ergebnisse für die Beschreibung der CNU bei Patienten mit T2DM und CKD eine starke Korrelation zwischen CNU und Albuminurie. Beiden Kollektiven mit MAU, sowohl T2DM als auch CKD, war ein signifikant häufigeres Auftreten einer CNU mit höheren CN1-Konzentrationen im Urin gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen ohne MAU gemein. Zu einem renalen Verlust passend zeigte sich bei jenen makroalbuminurischen Patienten ein gegenüber mikro- oder normoalbuminurischen Patienten erniedrigter CN1-Spiegel im Serum. In Analogie zum Auftreten einer Albuminurie bei renalem Permeabilitätsdefekt [136] lässt diese Assoziation zwischen ACR und CNU Rückschlüsse auf einen Defekt des Filtrationsmechanismus vermuten. Insbesondere auch die Tatsache, dass rekrutierte Probanden mit ausgeprägter Nierenfunktionseinschränkung (eGFR < 30 ml/min/1,73m²) die absolut gemessen niedrigsten CN1-Konzentrationen im Serum, aber andererseits auch die höchsten Spiegel im Urin zeigen, spricht für einen Verlust der CN1 in den Urin bei bestehender Grunderkrankung. Bestätigend zeigen unsere Ergebnisse eine positive Korrelation zwischen CNU- und Serum-CN1-Konzentrationen bei Patienten mit T2DM und CKD. Demnach ist von einer direkten Kommunikation der beiden Molekülfraktionen und freier Filtration bei bestehendem glomerulären Filtrationsdefekt auszugehen. Durch den Einschluss nicht-nephrotischer sowie lebergesunder Patienten postulieren wir, dass die geringe statistische Signifikanz der Korrelation durch eine kompensatorisch erhöhte Lebersynthese von CN1 bei renalem Verlust erklärt werden könnte. Eine gesteigerte Proteinsynthese der Leber im Sinne einer Aufrechterhaltung zirkulierender Konzentrationen wurde bereits von Prinsen et al. für Albumin und Fibrinogen beschrieben [137]. Diese Annahme stützend zeigen unsere Ergebnisse in der Subgruppe T2DM mit moderat eingeschränkter Nierenfunktion (eGFR 30-60 ml/min/1,73m²) vergleichbare CN1-Konzentrationen im Serum wie Patienten mit einer eGFR > 60 ml/min/1,73m² und damit erhaltener Nierenfunktion.

Doch auch der von Janssen et al. beschriebene Zusammenhang zwischen (CTG)_n-Polymorphismus und CN1-Konzentrationen im Serum [87, 116] wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. In allen Kollektiven, T2DM, CKD und Nierengesunde zeigen Träger des kurzen homozygoten (CTG)₅-Allels niedrigere CN1-Konzentrationen im Serum als solche mit mehr Leucin-Repeats im CNDP1-Genotyp. Die Tatsache, dass auch chronisch Nierenkranke nicht-diabetischer Genese diese Assoziationen aufweisen lässt auf die Annahme schließen, dass der (CTG)_n-Polymorphismus nicht nur Auswirkungen auf renale Pathologien diabetischer Genese hat, sondern auch bei anderen Nierenerkrankungen eine Rolle spielen könnte.

Niedrige CN1-Spiegel im Serum jener Träger des homozygoten (CTG)₅-Allels ohne renale Funktionseinschränkung könnten mit der bereits beschriebenen, erniedrigten Sekretion des Enzyms erklärt werden [87]. In paradoxem Gegensatz zu der initialen Hypothese einer CNU

auf dem Boden eines glomerulären Defekts zeigen unsere Ergebnisse jedoch auch bei T2DM mit dem homozygoten (CTG)₅-Allel höhere CN1-Serumspiegel als bei Patienten mit längeren Genvarianten. Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl für Männer als auch für Frauen mit T2DM. Prinzipiell wäre bei diesen Trägern der kurzen CNDP1-Genvariante aufgrund der renoprotektiven Eigenschaft mit konsekutiver Prävention eines glomerulären Filtrationsdefekts von höheren Konzentrationen im Serum auszugehen gegenüber Patienten mit längeren Genvarianten und entsprechend bereits fortgeschrittenerem renalen Schaden. Auch dieser konträre Sachverhalt könnte mit der Hypothese einer kompensatorisch gesteigerten hepatischen Synthese bei Patienten einer Genvariante mit elf oder mehr Leucinen und einem bereits vorhandenen Nierenfunktionsverlust assoziiert sein. Die Kompensationsmechanismen bei regredienten CN1-Konzentrationen im Serum von Patienten mit diabetischen und nicht-diabetischen Nephropathien könnten eine Grundlage künftiger Forschungsarbeiten darstellen.

Erstmals beschrieben wird mit dieser Arbeit, dass Patienten mit T2DM und dem homozygoten (CTG)₅-Allel verglichen mit Trägern längerer Genvarianten niedrigere CN1-Konzentrationen im Urin aufweisen. Dieser Sachverhalt spricht im Rahmen der nephroprotektiven Effekte des (CTG)₅-Allels erneut für eine Erhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere gegenüber Trägern längerer Genvarianten. Auch substratifiziert gemäß dem Ausmaß einer Albuminurie zeigte sich bei T2DM ohne MAU mit der (CTG)₅-Genvariante eine deutlich niedrigere CNU-Konzentration gegenüber allen anderen Genvarianten. Bei dem Kollektiv T2DM mit MAU zeigen sich für CNU hingegen nur noch geringfügige Konzentrationsunterschiede unter den verschiedenen CNDP1-Genotypen. Eine reduzierte Diurese im Rahmen der marginal erhaltenen Nierenfunktion bei bereits fortgeschrittenem Krankheitsstadium könnten die im Urin gemessenen CN1-Konzentrationen aus dem Spontanurin durch Verdünnungsfehler beeinträchtigen. Nur 14 % der für diese Arbeit rekrutierten Patienten verfügten noch über eine eGFR > 60 ml/min/1,73m², dies beschreibt in der Gesamtheit eine Population mit ausgeprägtem renalen Schaden. Ebenso könnte eine fortgeschrittene Niereninsuffizienz auch durch steigende Prävalenz eines Protein-Energie-Wasting [138] die Serum-CN1- und CNU-Konzentrationen beeinflussen. Tatsächlich wurden niedrige Serum CN1-Konzentrationen bereits bei Pathologien mit hohem Katabolismus wie Neoplasien und Leberzirrhose beschrieben [139-141]. Nicht zuletzt müssen bereits benannte Komorbiditäten wie die metabolische Azidose ebenso wie die Durchführung einer Nierenersatztherapie als Einflussfaktoren auf die gemessenen CN1-Konzentrationen bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium auch in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden [134, 135].

Da CNU, wie diese Ergebnisse zeigen, in geringerer Konzentration auch bei Nierengesunden auftritt, kann ein renaler Permeabilitätsdefekt das Phänomen der CNU jedoch nicht allein erklären. Die gemessenen CNU-Konzentrationen sind dabei 5,6fach geringer als jene des Kollektivs mit renaler Vorerkrankung. Demnach könnte gefolgert werden, dass es sich bei CNU per se nicht um ein pathologisches Phänomen handelt, im Rahmen einer Nierenfunktionseinschränkung wie der DN das Ausmaß einer CNU jedoch durch eine defekte Barriere des glomerulären Filters signifikant ansteigt. Ein Erklärungsansatz für CNU bei Nierengesunden könnte eine renale Elimination zur Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Carnosin-CN1-Gleichgewichts sein.

Ein Protein kann unter physiologischen Bedingungen über verschiedene Wege in das Tubuluslumen und somit in den Urin gelangen. Beschriebene Mechanismen sind die

glomeruläre Filtration, die tubuläre Sekretion sowie eine lokale Synthese im Nephron selbst [136]. Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus den Endothelzellen der Kapillaren, der Basalmembran und den Podozytenfortsätzen des inneren Blatts der Bowman Kapsel. Die Porengröße erlaubt Molekülen mit einem Durchmesser < 2 nm oder einem Molekulargewicht < 10 kDa die freie Passage, Moleküle > 4 nm bzw. > 50 kDa werden zurückgehalten [142]. Moleküle, deren Größe zwischen diesen Werten liegt, werden je nach elektrischem Ladungszustand mehr oder weniger filtriert [143]. Mit einer molekularen Masse von 57 kDa ist es unwahrscheinlich, dass CN1 durch freie, glomeruläre Filtration in das Tubuluslumen gelangt, sofern die Filtrationsbarriere intakt und unbeschädigt ist. Auch die mangelnde Korrelation der CN1-Konzentrationen im Serum und CNU des nierengesunden Kontrollkollektivs sprechen gegen eine freie Filtration in das Tubuluslumen und eher für eine lokale, renale Synthese oder tubuläre Sekretion.

Tatsächlich wurde die Detektion renaler CN1-mRNA und Proteinexpression unter Annahme eines intrinsichen Carnosin-CN1-Stoffwechsels beschrieben [87, 97, 125]. Sofern die Niere über einen eigenen Carnosin-Carnosinase-Metabolismus verfügt, könnte CNU möglicherweise nicht nur ein Eliminationsprodukt im Rahmen der Homöostase darstellen, sondern auch eine funktionelle Rolle für die Niere spielen. Während die höchsten CN1-Konzentrationen bei Gesunden in proximalen und distalen Tubuluszellen vorzufinden sind, zeigten Typ-2-Diabetiker eine Verlagerung des Konzentrationsmaximums in das proximale Tubulussegment sowie eine signifikant höhere renale Syntheserate [126]. Eine verstärkte diabetische Carnosinhydrolyse im Serum oder eine, dem Proteinverlust geschuldete, erhöhte tubuläre CN1 Reabsorptionsrate werden als mögliche Ursache diskutiert. Der proximale Tubulus bildet zusammen mit den Podozyten die erste Barriere des fenestrierten Endothels. Aufgrund der hohen Pufferkapazität von L-Carnosin könnte die renale Expression von CN1 die Funktion der pH-abhängigen, tubulären Transportsysteme bewahren. So könnten hohe CN1-Konzentrationen im proximalen Segment niedrige L-Carnosin-Spiegel aufrecht erhalten, um die im distalen Tubulus auf niedrige pH-Werte angewiesenen Protonenpumpen nicht zu beeinflussen [125]. Auch in gastralen Epithelzellen, deren Umgebung im physiologischen Zustand auf einen sehr niedrigen pH-Wert angewiesen ist, wurden hohe CN1-Konzentrationen beschrieben [144].

Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit gemessenen CN1-Konzentrationen im Urin sowohl gesunder als auch nierenkranker Probanden zehnfach bis hundertfach niedriger verglichen mit jenen im Serum sind, spricht jedoch eher für die Annahme CNU als Prozess der Elimination statt als Vorgang einer metabolischen Funktion zu betrachten. Vergleichbare Konzentrationsunterschiede zwischen Serum- und Urinfraktion zeigen sich für Albuminurie, welcher in Analogie keine funktionale Rolle zugeschrieben wurde und Albumin im Serum [142].

Bisher gibt es auch keinerlei Daten, die eine direkte Evidenz für eine renale CN1-Sekretion in das Tubuluslumen beschreiben. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch, dass CN1 im Serum anteilig in einer durch unseren ELISA nicht zu erfassenden, monomeren Proteinkonformation vorliegt [112] und basierend auf einem ähnlichen molekularen Gewicht und isoelektrischen Punkt wie Albumin durch Sekretion die Filtrationsbarriere überwinden kann. Tubuläre Sekretion ist ein aktiver Prozess, bei dem niedermolekulare Proteine sowie organisch gelöste Stoffe wie Anionen und Kationen über spezifische Transporter aus dem Blut in das proximale Tubuluslumen ausgeschieden werden. Die meisten im proximalen Tubulus aktiv transportierten Stoffe besitzen bei physiologischem pH-Wert eine positive oder negative

Nettoladung [145]. Im Rahmen einer Aufrechterhaltung der Carnosin-CN1-Homöostase bei Nierengesunden wäre eine aktive Sezernierung in das Tubuluslumen bei intakter glomerulärer Filtrationsbarriere ein möglicher Mechanismus.

Der beschriebene DNA-Polymorphismus auf dem Signalpeptid des CNDP1-Gens ermöglicht die zielgerichtete Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum und der CN1 schließlich die notwendige Sekretion in das Serum. Die Wiederholungsanzahl der CTG-Trinukleotide kodieren für unterschiedlich lange, hydrophobe Leucinkette in der N-terminalen Signalpeptidsequenz des CN1-Vorläuferpeptids. Entsprechend dieses beschriebenen Einfluss der CTG-Repeats im Signalpeptid auf die CN1-Sekretion im Serum [120] könnte ein vergleichbarer Zusammenhang auch für die renale Sekretion bestehen. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den Einfluss durch den CNDP1-Polymorphismus und Träger der kurzen, homozygoten (CTG)₅-Allels weisen signifikant niedrigere CN1-Konzentrationen im Serum auf. Es zeigt sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der CNDP1-Genvariante und CNU. Falls Serum-CN1 als monomere Struktur sezerniert wird, korreliert CNU demnach eher mit dieser Molekülfraktion als mit dem CNDP1-Genotyp. Das von uns entwickelte ELISA-System kann nicht zwischen mono- oder dimeren Proteinstrukturen unterscheiden. Auch der geringe Anteil an CN1 sowie die Anwesenheit von Harnstoff schwächen die Aussagekraft der Ergebnisse durch Western Blotting. Die genauen Vorgänge und Transportsysteme für CNU bei Nierengesunden bleiben Gegenstand künftiger Forschung, so wäre unter anderem zu klären, welchen Ladungszustand CN1 unter physiologischen pH-Werten aufweist, ob CN1 unter der Annahme einer funktionalen Rolle im Urin Enzymaktivität zeigt, und ob es spezifische Transporter für CN1 in den Tubuluszellen gibt. Um die Rolle des intrinsischen Carnosin-Carnosinase-Metabolismus und Zusammenhänge mit der DN genauer zu beschreiben, könnten auch Daten über die Regulation von Transkriptionsfaktoren bei Gesunden und T2DM aufschlussreich sein.

In geringen Konzentrationen ist auch Albuminurie bei nierengesunden Individuen beschrieben und wurde mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert [146]. In Analogie könnte CNU bei Gesunden auch einen diagnostischen Marker oder Risikofaktor diabetischer oder renaler Erkrankungen im Allgemeinen darstellen. Auch dieser Zusammenhang könnte in weiterführenden Studien mit einer größeren Fallzahl untersucht werden.

Ein bereits beschriebener Einflussfaktor des humanen Carnosin-CN1-Metabolismus ist der Glukosemetabolismus. Eine anhaltend hyperglykämie Stoffwechsellage vermindert demnach endogene L-Carnosin-Spiegel in der Niere [88] und Peters et al. beschreiben eine gesteigerte CN1-Konzentration im Nierengewebe diabetischer Mäuse [124]. Unsere Ergebnisse bestätigen diese tierexperimentellen Daten am Menschen, es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen dem gemessenen HbA1c und der CN1-Konzentration im Serum. Sowohl HbA1c als auch hohe CN1-Konzentrationen gelten als unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung einer DN [127, 147]. Im Rahmen der von Peters et al. beschriebenen Reduktion der CN1-Konzentrationen im Serum sowie des gemessenen HbA1c bei Mäusen unter L-Carnosin Substitution [124] wäre auch beim Menschen ein derartiger therapeutischer Effekt denkbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln erneut das therapeutische Potenzial des Carnosin-CN1-Metabolismus als neue Therapieoption für die Behandlung des Diabetes mellitus und der diabetischen Nephropathie wider. Weiterführende Forschungen, die humane CN1-Aktivität und -Konzentrationen unter L-Carnosin Substitution sowie mögliche Effekte auf die DN beschreiben, wären demnach von hohem Interesse. Assoziationen zwischen

Glukosurie und einem erhöhten Blutglukosespiegel sind in der Literatur vielfach beschrieben [148-150]. Der Einfluss des Glukosemetabolismus auf den humanen Carnosin-CN1-Metabolismus lässt auch einen Zusammenhang zwischen einer anhaltend hyperglykämischen Stoffwechsellage und CNU vermuten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für das Patientenkollektiv T2DM und CKD keinen messbaren Zusammenhang zwischen HbA1c und CNU. In Zusammenschau dieser Tatsachen bleibt CNU weiterhin als ein primär durch einen glomerulären Filtrationsdefekt beeinflussbares Phänomen zu betrachten, das in geringerem Ausmaß auch bei Gesunden auftritt. Aufgrund in der Vergangenheit beschriebener Assoziationen zwischen hohen Blutglukosespiegeln und der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie mit konsequentem glomerulären Schaden [34, 36, 37] sollten diese Ergebnisse jedoch aufgrund einer kleinen Fallzahl anhand einer größeren Studienpopulation verifiziert werden. Auch die Möglichkeit einer Limitation unserer Nachweismethode durch mangelnde Glykolisierung von CN1 im hyperglykämischen Milieu sollte bei der Bewertung der vorliegenden Ergebnisse Berücksichtigung finden.

Limitiert sind die vorliegenden Ergebnisse durch die Tatsache, dass es sich bei den verwendeten Urinproben um Spontanurin handelt und die Übertragbarkeit auf Daten aus 24-Stunden-Sammelurin hinreichend verifiziert werden muss. Für die Proteinurie als wichtiger Marker eines glomerulären Defekts im Rahmen einer fortschreitenden Nierenerkrankung wie der diabetischen Nephropathie stellte der 24-Stunden-Sammelurin lange die bewährteste diagnostische Methode dar. Aufgrund der schwierigen Tauglichkeit für den klinischen Alltag und der Urinsammlung als Fehlerquelle per se wurde sie zunehmend von der Bestimmung der ACR aus dem Spontanurin im Rahmen von Diagnostik und Therapieplanung abgelöst. Dennoch unterliegen die Messwerte für Proteinurie und Kreatinin-Ausscheidung tageszeitlichen Schwankungen, die auch im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt werden müssen. Wie präzise die bei unseren Probanden gemessenen Werte der ACR auf Proben aus 24-Stunden-Sammelurin übertragbar sind, bleibt in Frage zu stellen. Folglich muss auch hinterfragt werden, inwiefern Verdünnungsfehler und die Abhängigkeit der Tageszeit bei der Messung der CNU die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse beeinflussen. Jüngste noch unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen vergleichbare Ergebnisse in einer Analyse von CNU aus 24-Stunden-Sammelurin. Es scheint demnach, dass Spontanurin hinreichend verlässlich zur Messung einer CNU verwendet werden kann.

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Querschnittstudie, somit können keine Informationen über intraindividuelle Veränderungen und Entwicklungsverläufe gewonnen werden. Auch sind Alters- und Generationsunterschiede konfundiert und Unterschiede könnten möglicherweise auf einen Alterseffekt zurückgehen. Möglich ist, dass sich die medizinischen Bedingungen im Gegensatz zu einer wesentlich früher zurückliegenden Erstmanifestation des DM geändert haben. Die Unterschiede wären dann zu einem unbekanntem Anteil auch durch die Änderung dieser Rahmenbedingungen erklärbar. Die Ergebnisse gelten demnach für den Erhebungszeitpunkt, es bleibt jedoch fraglich, ob sie auch auf andere Zeitpunkte übertragbar sind. Nicht zuletzt handelt es sich um ein relativ kleines Kollektiv und die Ergebnisse sollten an einer größeren Studienpopulation verifiziert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die führende Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz in der westlichen Welt ist weiterhin die diabetische Nephropathie (DN). CN1, ein Enzym dessen Sekretion entscheidend von einem Polymorphismus im CNDP1-Gen beeinflusst wird, wurde als Risikofaktor für die Entwicklung einer DN beschrieben. Eine niedrige Serumkonzentration und Enzymaktivität mit konsekutiv hohen Spiegeln des Substrats L-Carnosin weisen dabei nephroprotektive Eigenschaften auf. Rezente Daten zeigten jedoch, dass Typ-2-Diabetiker mit DN und eingeschränkter Nierenfunktionseinschränkung niedrigere CN1-Konzentrationen im Serum aufweisen als Patienten mit erhaltener Nierenfunktion. Die Hypothese einer defekten, glomerulären Filtrationsbarriere mit konsekutivem CN1-Verlust über den Urin bei zunehmender renaler Schädigung im Rahmen der DN ist Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Chronisch nierenkranke Patienten diabetischer und nicht-diabetischer Genese sowie ein gesundes Kontrollkollektiv wurden für diese Arbeit rekrutiert und ein ELISA-System für den Nachweis von CN1 im Urin entwickelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass CNU in unterschiedlicher Ausprägung sowohl bei Gesunden wie auch bei chronisch nierenkranken Patienten nachweisbar ist. Die Hauptaussagen dieser Arbeit stützen dabei die Hypothese einer Assoziation der CNU mit einem renalen Permeabilitätsdefekt bei chronischer Nierenerkrankung und sind folgende:

1. Die gemessenen CNU-Konzentrationen sind bei Patienten mit renaler Grunderkrankung im Durchschnitt 5,6fach höher als bei einem gesunden Kontrollkollektiv.
2. CNU ist bei Patienten mit MAU häufiger detektierbar und höher konzentriert verglichen mit Patienten ohne MAU.
3. Es besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen CNU und ACR.
4. Patienten mit fortgeschrittener Nierenfunktionseinschränkung ($eGFR < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$) zeigen höhere CNU-Konzentrationen gegenüber Patienten mit erhaltener Nierenfunktion.
5. Eine signifikant positive Korrelation zwischen Serum-CN1-Konzentration und CNU zeigt sich für die Gesamtheit des Patientenkollektivs T2DM und CKD.

Es ist demnach von einer Kommunikation zwischen den beiden Molekülfraktionen, CN1 im Serum und CNU, und folglich einer freien Filtration im Rahmen eines Permeabilitätsdefektes in den Urin auszugehen. Bei intakter glomerulärer Barriere wäre eine Filtration aufgrund der molekularen Masse von CN1 unwahrscheinlich. Möglicherweise ist eine geringfügige CNU bei Gesunden demnach auf einen intrinsischen Metabolismus mit renaler Synthese und Sekretion zurückzuführen, dies sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass CNU bei chronisch Nierenkranken diabetischer und nicht-diabetischer Genese in signifikant höheren Konzentrationen als bei Gesunden nachweisbar ist. Im Rahmen der Grunderkrankung ist die Differenz am ehesten auf einen CN1-Verlust in den Urin, bei glomerulärem Permeabilitätsdefekt zurückzuführen. Insgesamt spiegeln die Ergebnisse der Arbeit das Potenzial des Carnosin-CN1-Metabolismus als Therapieoption für die Behandlung des Diabetes mellitus und der diabetischen Nephropathie wider.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Warram, J.H., et al., Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med*, 1990. 113(12): p. 909-15.
2. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 2001. 414(6865): p. 782-7.
3. Kerner, W., J. Bruckel, and A. German Diabetes, Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2014. 122(7): p. 384-6.
4. American Diabetes, A., 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 2016. 39 Suppl 1: p. S13-22.
5. Federation, I.D. IDF Diabetes Atlas. 2014; 6.: [Available from: https://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf].
6. Federation, I.D., IDF Diabetes Atlas. 2017, International Diabetes Federation: Brussels, Belgium.
7. Tamayo, T., et al., Diabetes in Europe: an update. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014. 103(2): p. 206-17.
8. Group, I.D.F.D.A., Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. *Diabetes Res Clin Pract*, 2015. 109(3): p. 461-5.
9. Hoffmann, F. and A. Icks, Diabetes prevalence based on health insurance claims: large differences between companies. *Diabet Med*, 2011. 28(8): p. 919-23.
10. Morgan, C.L., C.J. Currie, and J.R. Peters, Relationship between diabetes and mortality: a population study using record linkage. *Diabetes Care*, 2000. 23(8): p. 1103-7.
11. Icks, A., et al., Themenheft 24 "Diabetes mellitus". 2005, Robert Koch-Institut.
12. Finger, R.P., et al., Prevalence and causes of registered blindness in the largest federal state of Germany. *Br J Ophthalmol*, 2011. 95(8): p. 1061-7.
13. Herold, G., *Innere Medizin*. 2015, Köln: Herold.
14. Ruggenti, P., et al., Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2004. 351(19): p. 1941-51.
15. Ravid, M., et al., Use of enalapril to attenuate decline in renal function in normotensive, normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, 1998. 128(12 Pt 1): p. 982-8.
16. 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.
17. Ritz, E., et al., End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis*, 1999. 34(5): p. 795-808.
18. Dronavalli, S., I. Duka, and G.L. Bakris, The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008. 4(8): p. 444-52.
19. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungsleitlinie Nierenerkrankungen bei Diabetes im Erwachsenenalter. 2011; 2.: [Available from: <http://www.diabetes.versorgungsleitlinien.de>].
20. Menne, J. and H. Haller, [Diabetic nephropathy]. *Internist (Berl)*, 2011. 52(5): p. 495-504.
21. Samann, A. and G. Wolf, [Diabetic nephropathy]. *Internist (Berl)*, 2012. 53(10): p. 1195-206.

22. Ibrahim, H.N. and T.H. Hostetter, Diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 1997. 8(3): p. 487-93.
23. Mogensen, C.E., How to protect the kidney in diabetic patients: with special reference to IDDM. *Diabetes*, 1997. 46 Suppl 2: p. S104-11.
24. Scherbaum, W. and E. Ritz, Prävention und Therapie der diabetischen Nephropathie. *Dtsch Arztebl International*, 2005. 102(3): p. 137-.
25. Adler, A.I., Guilt, or guilt by association? Insulin therapy in type 2 diabetes and death. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017. 5(1): p. 7-8.
26. Gregg, E.W., et al., Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990-2010. *N Engl J Med*, 2014. 370(16): p. 1514-23.
27. Hoffmann, F., et al., The effect of diabetes on incidence and mortality in end-stage renal disease in Germany. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2011. 26(5): p. 1634-1640.
28. Haffner, S.M., et al., Is microalbuminuria part of the prediabetic state? The Mexico City Diabetes Study. *Diabetologia*, 1993. 36(10): p. 1002-6.
29. Lambers Heerspink, H.J., et al., Albuminuria assessed from first-morning-void urine samples versus 24-hour urine collections as a predictor of cardiovascular morbidity and mortality. *Am J Epidemiol*, 2008. 168(8): p. 897-905.
30. Heller, T., et al., [Diabetic co-morbidities: prevalences in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2014. 139(15): p. 786-91.
31. Dinneen, S.F. and H.C. Gerstein, The association of microalbuminuria and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A systematic overview of the literature. *Arch Intern Med*, 1997. 157(13): p. 1413-8.
32. Xu, M., et al., Type 2 Diabetes, Diabetes Genetic Score and Risk of Decreased Renal Function and Albuminuria: A Mendelian Randomization Study. *EBioMedicine*, 2016. 6: p. 162-70.
33. Jefferson, J.A., S.J. Shankland, and R.H. Pichler, Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int*, 2008. 74(1): p. 22-36.
34. Wolf, G., New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest*, 2004. 34(12): p. 785-96.
35. Li, J. and G. Gobe, Protein kinase C activation and its role in kidney disease. *Nephrology (Carlton)*, 2006. 11(5): p. 428-34.
36. Yamagishi, S. and T. Matsui, Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev*, 2010. 3(2): p. 101-8.
37. Sun, Y.M., et al., Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 433(4): p. 359-61.
38. Villeneuve, L.M., M.A. Reddy, and R. Natarajan, Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011. 38(7): p. 451-9.
39. Yuan, H., et al., Epigenetic Histone Modifications Involved in Profibrotic Gene Regulation by 12/15-Lipoxygenase and Its Oxidized Lipid Products in Diabetic Nephropathy. *Antioxid Redox Signal*, 2015.
40. Schlosser, M.W., G.; Hasslacher, C., Nephropathie bei Diabetes. *Diabetologie*, 2017. 12(2): p. 115-120.
41. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney international supplements*, 2012. 3: p. 1.

42. Ibsen, H., et al., Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension*, 2005. 45(2): p. 198-202.
43. Werth, S., H. Lehnert, and J. Steinhoff, [Diabetic nephropathy: current diagnostics and treatment]. *Internist (Berl)*, 2015. 56(5): p. 513-9.
44. Guiotto, A., et al., Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr Med Chem*, 2005. 12(20): p. 2293-315.
45. Boldyrev, A.A., Carnosine: new concept for the function of an old molecule. *Biochemistry (Mosc)*, 2012. 77(4): p. 313-26.
46. Reddy, W.J. and D.M. Hegsted, The measurement and distribution of carnosine in the rat. *J Biol Chem*, 1962. 237: p. 705-6.
47. Horinishi, H., M. Grillo, and F.L. Margolis, Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *J Neurochem*, 1978. 31(4): p. 909-19.
48. Wood, M.R. and P. Johnson, Purification of carnosine synthetase from avian muscle by affinity chromatography and determination of its subunit structure. *Biochim Biophys Acta*, 1981. 662(1): p. 138-44.
49. Boldyrev, A.A. and S.E. Severin, The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv Enzyme Regul*, 1990. 30: p. 175-94.
50. Bulygina, E.R. and G.G. Kramarenko, [Isolation of carnosine synthetase from animal and human muscles]. *Vopr Med Khim*, 1995. 41(6): p. 27-30.
51. Tsubone, S., et al., Purification and characterization of a novel imidazole dipeptide synthase from the muscle of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007. 146(4): p. 560-7.
52. 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.
53. Gjessing, L.R., et al., Inborn errors of carnosine and homocarnosine metabolism. *J Neural Transm Suppl*, 1990. 29: p. 91-106.
54. Mannion, A.F., et al., Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1992. 64(1): p. 47-50.
55. 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.
56. Hill, C.A., et al., Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids*, 2007. 32(2): p. 225-33.
57. Everaert, I., et al., Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino Acids*, 2011. 40(4): p. 1221-9.
58. Baguet, A., et al., The influence of sex, age and heritability on human skeletal muscle carnosine content. *Amino Acids*, 2012. 43(1): p. 13-20.
59. Flancbaum, L., et al., The presence and significance of carnosine in histamine-containing tissues of several mammalian species. *Agents Actions*, 1990. 31(3-4): p. 190-6.
60. 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.
61. Fitzpatrick, J.C., H. Fisher, and L. Flancbaum, Mobilization of renal carnosine and histidine to histamine during compound-48/80-induced shock. *Nephron*, 1991. 59(2): p. 299-303.

62. Gil-Agusti, M., J. Esteve-Romero, and S. Carda-Broch, Anserine and carnosine determination in meat samples by pure micellar liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2008. 1189(1-2): p. 444-50.
63. Yeum, K.J., et al., Profiling histidine dipeptides in plasma and urine after ingesting beef, chicken or chicken broth in humans. *Amino Acids*, 2010. 38(3): p. 847-58.
64. Tamaki, N., et al., Carnosine as a histidine source: transport and hydrolysis of exogenous carnosine by rat intestine. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1985. 31(6): p. 607-18.
65. Ferraris, R.P., J. Diamond, and W.W. Kwan, Dietary regulation of intestinal transport of the dipeptide carnosine. *Am J Physiol*, 1988. 255(2 Pt 1): p. G143-50.
66. 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.
67. Bauchart, C., et al., Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release into the portal vein of minipigs. *J Nutr*, 2007. 137(3): p. 589-93.
68. Quinn, P.J., A.A. Boldyrev, and V.E. Formazuyk, Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med*, 1992. 13(5): p. 379-444.
69. Bauer, K., Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. *Neurochem Res*, 2005. 30(10): p. 1339-45.
70. Derave, W., et al., Muscle carnosine metabolism and beta-alanine supplementation in relation to exercise and training. *Sports Med*, 2010. 40(3): p. 247-63.
71. 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.
72. Decker, E.A., S.A. Livisay, and S. Zhou, A re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine. *Biochemistry (Mosc)*, 2000. 65(7): p. 766-70.
73. Reddy, V.P., et al., Carnosine: a versatile antioxidant and antiglycating agent. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2005. 2005(18): p. pe12.
74. Hipkiss, A.R., et al., Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. 854: p. 37-53.
75. Aldini, G., P. Granata, and M. Carini, Detoxification of cytotoxic alpha,beta-unsaturated aldehydes by carnosine: characterization of conjugated adducts by electrospray ionization tandem mass spectrometry and detection by liquid chromatography/mass spectrometry in rat skeletal muscle. *J Mass Spectrom*, 2002. 37(12): p. 1219-28.
76. Hipkiss, A.R., et al., Reaction of carnosine with aged proteins: another protective process? *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 959: p. 285-94.
77. Hipkiss, A.R., J. Michaelis, and P. Syrris, Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett*, 1995. 371(1): p. 81-5.
78. Hipkiss, A.R., et al., Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett*, 1997. 238(3): p. 135-8.
79. McFarland, G.A. and R. Holliday, Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. *Exp Cell Res*, 1994. 212(2): p. 167-75.
80. Hipkiss, A.R., Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. 30(8): p. 863-8.
81. McFarland, G.A. and R. Holliday, Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol*, 1999. 34(1): p. 35-45.
82. Gallant, S., M. Semyonova, and M. Yuneva, Carnosine as a potential anti-senescence drug. *Biochemistry (Mosc)*, 2000. 65(7): p. 866-8.

83. Wang, A.M., et al., Use of carnosine as a natural anti-senescence drug for human beings. *Biochemistry (Mosc)*, 2000. 65(7): p. 869-71.
84. Yuneva, A.O., et al., Effect of carnosine on *Drosophila melanogaster* lifespan. *Bull Exp Biol Med*, 2002. 133(6): p. 559-61.
85. Sauerhofer, S., et al., L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. *Diabetes*, 2007. 56(10): p. 2425-32.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. Koppel, H., et al., L-carnosine inhibits high-glucose-mediated matrix accumulation in human mesangial cells by interfering with TGF-beta production and signalling. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. 26(12): p. 3852-8.
90. 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.
91. 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.
92. Hanson, H.T. and E.L. Smith, Carnosinase; an enzyme of swine kidney. *J Biol Chem*, 1949. 179(2): p. 789-801.
93. Lenney, J.F., Human cytosolic carnosinase: evidence of identity with prolinase, a non-specific dipeptidase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1990. 371(2): p. 167-71.
94. 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.
95. Perry, T.L., S. Hansen, and D.L. Love, Serum-carnosinase deficiency in carnosinaemia. *Lancet*, 1968. 1(7554): p. 1229-30.
96. Lenney, J.F., et al., Homocarnosinosis: lack of serum carnosinase is the defect probably responsible for elevated brain and CSF homocarnosine. *Clin Chim Acta*, 1983. 132(2): p. 157-65.
97. 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.
98. Everaert, I., et al., Low plasma carnosinase activity promotes carnosinemia after carnosine ingestion in humans. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. 302(12): p. F1537-44.
99. Boldyrev, A.A., G. Aldini, and W. Derave, Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*, 2013. 93(4): p. 1803-45.
100. Cohen, M., et al., Serum carnosinase deficiency: a non-disabling phenotype? *J Ment Defic Res*, 1985. 29 (Pt 4): p. 383-9.
101. Lunde, H.A., L.R. Gjessing, and O. Sjaastad, Homocarnosinosis: influence of dietary restriction of histidine. *Neurochem Res*, 1986. 11(6): p. 825-38.
102. Wassif, W.S., et al., The relationship between muscle fibre atrophy factor, plasma carnosinase activities and muscle RNA and protein composition in chronic alcoholic myopathy. *Alcohol Alcohol*, 1993. 28(3): p. 325-31.
103. Wassif, W.S., et al., Serum carnosinase activities in central nervous system disorders. *Clin Chim Acta*, 1994. 225(1): p. 57-64.

104. McLoughlin, D.M., et al., Metabolic abnormalities associated with skeletal myopathy in severe anorexia nervosa. *Nutrition*, 2000. 16(3): p. 192-6.
105. Balion, C.M., et al., Brain type carnosinase in dementia: a pilot study. *BMC Neurol*, 2007. 7: p. 38.
106. Perry, T.L., et al., Carnosinemia. A new metabolic disorder associated with neurologic disease and mental defect. *N Engl J Med*, 1967. 277(23): p. 1219-27.
107. van Heeswijk, P.J., et al., A patient with a deficiency of serum-carnosinase activity. *Acta Paediatr Scand*, 1969. 58(6): p. 584-92.
108. Terplan, K.L. and H.L. Cares, Histopathology of the nervous system in carnosinase enzyme deficiency with mental retardation. *Neurology*, 1972. 22(6): p. 644-55.
109. Murphey, W.H., et al., Serum carnosinase deficiency concomitant with mental retardation. *Pediatr Res*, 1973. 7(7): p. 601-6.
110. Willi, S.M., et al., A deletion in the long arm of chromosome 18 in a child with serum carnosinase deficiency. *Pediatr Res*, 1997. 41(2): p. 210-3.
111. Burgess, E.A., et al., Plasma carnosinase deficiency in patients with urea cycle defects. *Clin Chim Acta*, 1975. 61(2): p. 215-8.
112. Peters, V., et al., Relevance of allosteric conformations and homocarnosine concentration on carnosinase activity. *Amino Acids*, 2010. 38(5): p. 1607-15.
113. Vardarli, I., et al., Gene for susceptibility to diabetic nephropathy in type 2 diabetes maps to 18q22.3-23. *Kidney Int*, 2002. 62(6): p. 2176-83.
114. Pettitt, D.J., et al., Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1990. 33(7): p. 438-43.
115. Bowden, D.W., et al., A genome scan for diabetic nephropathy in African Americans. *Kidney Int*, 2004. 66(4): p. 1517-26.
116. 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.
117. Bakker, S.J., et al., Re: Exclusion of polymorphisms in carnosinase genes (*CNDP1* and *CNDP2*) as a cause of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: results of large case-control and follow-up studies. *Diabetes*, 2008. 57(12): p. e16; author reply e17.
118. Wanic, K., et al., Exclusion of polymorphisms in carnosinase genes (*CNDP1* and *CNDP2*) as a cause of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: results of large case-control and follow-up studies. *Diabetes*, 2008. 57(9): p. 2547-51.
119. Zhu, J.M., et al., D18S880 microsatellite polymorphism of carnosinase gene and diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2013. 17(4): p. 289-94.
120. 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.
121. Freedman, B.I., et al., Genetic susceptibility contributes to renal and cardiovascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Hypertension*, 2006. 48(1): p. 8-13.
122. Ahluwalia, T.S., E. Lindholm, and L.C. Groop, Common variants in *CNDP1* and *CNDP2*, and risk of nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2011. 54(9): p. 2295-302.
123. Sutariya, B., D. Jhonsa, and M.N. Saraf, TGF-beta: the connecting link between nephropathy and fibrosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016. 38(1): p. 39-49.
124. Peters, V., et al., Carnosine treatment largely prevents alterations of renal carnosine metabolism in diabetic mice. *Amino Acids*, 2012. 42(6): p. 2411-6.

125. Peters, V., et al., Intrinsic carnosine metabolism in the human kidney. *Amino Acids*, 2015. 47(12): p. 2541-50.
126. Peters, V., et al., Carnosine metabolism in diabetes is altered by reactive metabolites. *Amino Acids*, 2015. 47(11): p. 2367-76.
127. Zhang, S., et al., Carnosinase concentration, activity, and CNDP1 genotype in patients with type 2 diabetes with and without nephropathy. *Amino Acids*, 2019. 51(4): p. 611-617.
128. Rodriguez-Nino, A., et al., Detection of carnosinase-1 in urine of healthy individuals and patients with type 2 diabetes: correlation with albuminuria and renal function. *Amino Acids*, 2019. 51(1): p. 17-25.
129. Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung. 2013 April 2014; 1.: [Available from: http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/NVL_Typ-2_Therapie-lang_Apr_2014.pdf.
130. Levey, A.S., et al., A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 2009. 150(9): p. 604-12.
131. Adelman, K., et al., Different conformational forms of serum carnosinase detected by a newly developed sandwich ELISA for the measurements of carnosinase concentrations. *Amino Acids*, 2012. 43(1): p. 143-51.
132. McDonough, C.W., et al., The influence of carnosinase gene polymorphisms on diabetic nephropathy risk in African-Americans. *Hum Genet*, 2009. 126(2): p. 265-75.
133. Kim, S., et al., Examination of association with candidate genes for diabetic nephropathy in a Mexican American population. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010. 5(6): p. 1072-8.
134. Greiber, S. and W.E. Mitch, Mechanisms for protein catabolism in uremia: metabolic acidosis and activation of proteolytic pathways. *Miner Electrolyte Metab*, 1992. 18(2-5): p. 233-6.
135. Lim, V.S. and J.D. Kopple, Protein metabolism in patients with chronic renal failure: role of uremia and dialysis. *Kidney Int*, 2000. 58(1): p. 1-10.
136. James, M.T., et al., A Meta-analysis of the Association of Estimated GFR, Albuminuria, Diabetes Mellitus, and Hypertension With Acute Kidney Injury. *Am J Kidney Dis*, 2015. 66(4): p. 602-12.
137. Prinsen, B.H., et al., Increased albumin and fibrinogen synthesis rate in patients with chronic renal failure. *Kidney Int*, 2003. 64(4): p. 1495-504.
138. Obi, Y., et al., Latest consensus and update on protein-energy wasting in chronic kidney disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015. 18(3): p. 254-62.
139. 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.
140. Gautam, P., et al., Proteins with altered levels in plasma from glioblastoma patients as revealed by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e46153.
141. Arner, P., et al., Circulating carnosine dipeptidase 1 associates with weight loss and poor prognosis in gastrointestinal cancer. *PLoS One*, 2015. 10(4): p. e0123566.
142. Levey, A.S., C. Becker, and L.A. Inker, Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. *JAMA*, 2015. 313(8): p. 837-46.
143. Kretz, F.J. and F. Teufel, *Anästhesie und Intensivmedizin*, in *Physiologisches Wissen - Niere und Narkose*. 2006, Springer: Heidelberg. p. 94-95.

144. Teufel, M., P. Roggentin, and R. Schauer, Properties of sialidase isolated from *Actinomyces viscosus* DSM 43798. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1989. 370(5): p. 435-43.
145. Pelis, R.M. and S.H. Wright, Renal transport of organic anions and cations. *Compr Physiol*, 2011. 1(4): p. 1795-835.
146. Noyes, A.M. and K. Eckardt, Microalbuminuria as a risk factor for cardiovascular disease in healthy individuals: a case report and review of the literature. *Conn Med*, 2013. 77(7): p. 399-402.
147. Liang, S., et al., Clinical factors associated with the diagnosis and progression of diabetic nephropathy. *Cell Biochem Biophys*, 2014. 70(1): p. 9-15.
148. Mano, T. and H. Fujita, [Renal glucosuria and diabetes mellitus]. *Horumon To Rinsho*, 1978. 26(9): p. 854-8.
149. Cowart, S.L. and M.E. Stachura, Glucosuria, in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, rd, et al., Editors. 1990: Boston.
150. Beenken, A., Glucosuria and Prognosis in Acute Kidney Injury. *Kidney Int Rep*, 2019. 4(9): p. 1203-1204.

7. LEBENSLAUF

PERSONALIEN

Name: Anna Sofia Herold
Geburtsdatum: 1. Mai 1989
Geburtsort: Heidelberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Vater: Albert Herold
Mutter: Margit Beichert-Herold

SCHULISCHER WERDEGANG

1995 - 1999 Friedrich-Ebert-Grundschule, Ilvesheim
1999 - 2008 Elisabeth-von-Thadden-Gymnasium, Heidelberg
30.06.2008 Abitur, Elisabeth-von-Thadden-Gymnasium, Heidelberg

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

2010 - 2011 Studium der Zahnmedizin, Universität Mainz
2011 - 2012 Studium der Humanmedizin, Vorklinischer Abschnitt, Universität Göttingen
2012 - 2013 Studium der Humanmedizin, Vorklinischer Abschnitt, Universität Magdeburg
17.09.2013 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2013 - 2016 Studium Humanmedizin, Klinischer Abschnitt, Universität Heidelberg Fakultät Mannheim
13.10.2016 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2016 - 10/2017 Praktisches Jahr
1. Quartal: Chirurgie, Hôpitaux Robert Schuman, Luxembourg
2. Quartal: Ambulanz für Kinder- und Jugendpsychiatrie, St. Anastifts Krankenhaus, Ludwigshafen

3. Quartal: Innere Medizin, Universitätsspital Basel

4. Quartal: Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum
Mannheim

07.11.2017

3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

BERUFLICHER WERDEGANG

2010 - 2012

Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für
Anatomie, Universität Mainz

Seit 01/2018

Assistenzärztin für Kinder- und Jugendmedizin,
Universitätsklinikum Heidelberg

8. DANKSAGUNG

An vorderster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Benito Yard für die Überlassung dieses spannenden und herausfordernden Themas bedanken, wie auch für seinen ausführlichen, überaus freundlichen und konstruktiven Rat. Ebenso danke ich dem Laborteam der V. Medizinischen Klinik, im Besonderen, Anette Breedijk und Renate Stein für die Labortätigkeit und Unterstützung bei der Bearbeitung der Proben sowie Angelica Rodríguez-Niño für ihre unerlässliche, vielfältige Hilfe bei den Analysen und dem Verständnis der Thematik.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. med. Sibylle Hauske für ihre Freundschaft, die freundliche Betreuung und Unterstützung im Rahmen der Arbeit und auch über diese hinaus bedanken.

Dank gilt auch den Mitarbeitern der V. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, die es mir ermöglicht haben, ihre Patienten für diese Arbeit zu rekrutieren und mich bei der Probengewinnung unterstützt haben.

Weiterhin danke ich meinen Eltern und all jenen Menschen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und die Vollendung ermöglicht haben - insbesondere Uwe Göttmann, für sein unermüdliches Motivieren, die liebevolle Fürsorge und geduldige Unterstützung.