



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

Der Einfluss von Glukose und Methylglyoxal auf die Genexpression und Kommunikation kokultivierter Podozyten und glomerulärer Endothelzellen in der Pathogenese der Diabetischen Nephropathie

Autor: Michael Albrecht
Institut / Klinik: European Center for Angioscience (ECAS). Mikrovaskuläre Biologie und Pathobiologie
Doktorvater: Prof. Dr. J. Sleeman

Weltweit leiden über 450 Millionen Menschen an Diabetes Mellitus. Besonders gefährlich ist die Entwicklung diabetischer Folgeschäden, insbesondere mikrovaskulärer Komplikationen, die im Rahmen des DM auftreten können. Diese beinhalten neben der Diabetischen Neuro – und Retinopathie auch die Diabetische Nephropathie (DN). Die DN entwickelt sich meist Jahre bis Jahrzehnte nach Manifestation des DM und ist inzwischen die Hauptursache für ein terminales Nierenversagen in Deutschland. Sie verursacht eine progressive Schädigung der Filtrationsbarriere in den Nierenkörperchen. Diese Barriere wird außen durch spezialisierte Epithelzellen, genannt Podozyten, und innen durch glomeruläre Endothelzellen (GECs) gebildet. Alterationen in der Integrität, Struktur und Kommunikation beider Zelltypen tragen entscheidend zur Pathogenese der DN in der Frühphase bei, häufig noch bevor die ersten klinischen Symptome auftreten. Neben Hyperglykämie spielen auch Mediatoren wie Advanced Glycation Endproducts (AGEs) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese. Ein prominenter Vorläufer von AGEs stellt das Methylglyoxal (MGO) dar, ein Nebenprodukt aus Stoffwechselfvorgängen wie der Glykolyse. Inzwischen existieren Zelllinien aus konditionell immortalisierten Podozyten und GECs humanen Ursprungs. Diese wurden mit einem thermosensitiven SV40 large T Antigen transduziert, sodass beide Zelltypen bei 33 °C in Kultur vermehrt werden können. Bei 37 °C kommt es zur Inaktivierung des large T Antigens und zur Ausdifferenzierung der Zellen in ihren entsprechenden Phänotyp.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde ein Transwell-Cokulturmodell von konditionell immortalisierten Podozyten und GECs etabliert. Dabei wurden Podozyten in den Einsatz („Insert“) und GECs in räumlicher Nähe auf den Boden der Platte gesät. Eine Membran mit 0.4 µm Poren im Einsatz ermöglicht den Austausch von löslichen Stoffen zwischen den Zellen. Diese Cokultur wurde einerseits mit einer erhöhten Glukosekonzentration (25 mM, Hyperglykämie, „HG“) und mit Methylglyoxal (200 µM, „MGO“) für vier Tage stimuliert und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die differentiell regulierten Gene wurden mittels RNA-Sequenzierung detektiert und analysiert. Es ergaben sich sehr unterschiedliche Expressionsmuster für GECs und Podozyten unter HG und MGO. Podozyten reagierten stärker auf HG-Bedingungen als GECs, während MGO einen stärkeren Effekt auf GECs hatte. Unter HG-Bedingungen war eine Hochregulierung von „immediate early response“-Genen in GECs sehr auffällig, insbesondere die Genfamilie der Early Growth Response Gene 1-3 (EGR 1-3). Dies traf für EGR1 und EGR3 auch auf Podozyten zu, die unerwarteterweise eine Anzahl an in HG-Bedingungen herunterregulierten Extrazellulären Matrixgenen zeigten (COL3A1, ITGB6, COL11A1). Weiterhin fanden sich inflammatorische Cytokine und Chemokine in GECs erhöht (CXCL1, CXCL3, CSF2). Hochregulierte Gene unter MGO in GECs umfassten vor allem Gene des Zellzyklus und der DNA-Replikation. Zusätzlich erwiesen sich die DNA-Bindeproteininhibitoren ID1 und ID3 als signifikant erhöht. Die differentiell exprimierten Gene wurden mittels qPCR validiert. Auffällig ist, dass diese Regulierung nur in Cokultur von GECs und Podozyten auftrat, nicht in Monokultur. Dies lässt auf einen Crosstalk beider Zelltypen schließen. Zuletzt konnte die veränderte Expression von COL3A1, repräsentativ für HG in Podozyten, und ID3, repräsentativ für MGO in GECs, mittels Immunfluoreszenz in einem etablierten DN-Mausmodell (BTBR *ob/ob*) validiert werden. Die Doktorarbeit gibt damit Hinweise darauf, welche Genveränderungen in einem Milieu ähnlich der Frühphase der DN in Podozyten und GECs stattfinden. Damit trägt diese Arbeit Ihren Teil dazu bei, die ersten Stadien der Erkrankung besser zu verstehen und Kandidatengene zu identifizieren, die in der Frühphase der Pathogenese der DN mitwirken könnten.