

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Untersuchungen möglicher genetischer Ursachen von renalen
Endorganschäden bei hypertensiven Munich Wistar Frömter-
Ratten.“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Antonia Susi Herlan

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstrakt.....	1
Einleitung	3
Zielstellung.....	5
Methodik	6
Ergebnisse	9
Diskussion.....	13
Literaturverzeichnis	17
Anteilerklärung.....	A
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	B
Lebenslauf	C
Komplette Publikationsliste	D
Eidesstattliche Versicherung	E
Danksagung	F

Zusammenfassung

Abstrakt

Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte stellt ein geeignetes Tiermodell dar, um die Entwicklung von Bluthochdruck und dessen Folgeschäden zu untersuchen, da MWF-Tiere eine milde spontane Hypertonie zusammen mit einer progressiven Albuminurie ausbilden. Weiterhin weisen MWF-Ratten einen sexuellen Dimorphismus bezüglich des Nierenschadens auf: MWF-Männchen bilden eine stärkere Albuminurie mit Glomerulosklerose aus als Weibchen. In Vorarbeiten wurde ein Verlust der podozytären Podoplanin-Expression als frühe pathophysiologische Veränderung nachgewiesen. Zusätzlich haben MWF-Ratten eine deutlich reduzierte Nephronzahl, die in der 4. Woche gegenüber Albuminurie-resistenten spontan hypertensiven Ratten (SHR) um 27 % erniedrigt und bereits im Embryonalstadium nachweisbar ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst mittels fetaler Genexpressionsanalysen (Microarray-Technologie) Kandidatengene für das angeborene Nephrondefizit bei MWF identifiziert. Die Expression der Kandidatengene wurde anschließend im Zeitverlauf am frühembryonalen Entwicklungstag (E)15,5, im spätfetalen Stadium E19,0 und im Alter von 4 Wochen nach Abschluss der Nephrogenese per Reverse Transcription-qPCR quantifiziert. Als Referenzstamm dienten SHR nach sogenanntem Stage-Matching an E16,0 bzw. E19,5. Weiterhin wurde der Einfluss von Testosteron auf die Albuminurieentwicklung bei männlichen MWF-Ratten analysiert. Hierfür wurde die renale Albuminausscheidung adulter Tiere nach Orchiektomie (Ox), nach Ox mit Testosteron-Substitution und zusätzlicher Androgenrezeptorblockade mit Flutamid (OxTF) im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren (Sham) untersucht.

Die Transkriptom-Analyse von MWF und SHR ergab 311 signifikant differentiell exprimierte Transkripte, von denen sieben auf Rattenchromosom 6 lokalisiert waren, dessen Einfluss auf die Ausbildung von Albuminurie und Nephronzahl beim MWF-Stamm in Vorarbeiten nachgewiesen wurde. Vier Gene waren bei MWF signifikant hochreguliert (*Abcg5*, *Ab1-233*, *Efcab11*, *Gpx2*) und drei Gene waren signifikant niedriger exprimiert (*Fntb*, *Lrrn3*, *Rtn1*). Besonders interessant war das Gen Glutathionperoxidase 2 (*Gpx2*), dessen Expression in murinen embryonalen Nieren bereits beschrieben wurde. *Gpx2* war in allen drei Altersstadien bei MWF gegenüber SHR signifikant hochreguliert.

Die Testosteron-Studie ergab für MWF Sham den erwarteten progressiven Verlauf der Albuminurie, die in der 18. Woche Werte von $48,30 \pm 6,16$ mg/24h erreichte. Nach Kastration verminderte sich die Albuminurie gegenüber Sham um mehr als die Hälfte. In der OxTF-Gruppe wurde trotz erhöhter Testosteron-Serumspiegel nach Testosteron-Substitution die Albuminurie durch Flutamid unterdrückt und lag mit Werten von $6,40 \pm 1,19$ mg/24h signifikant unter dem Niveau der unbehandelten Ox-Gruppe.

Weiterhin konnte *in vitro* in einer humanen Podozyten-Zelllinie ein direkter Zusammenhang zwischen einer Stimulation mit Angiotensin II und einer verminderten Podoplanin-Expression nachgewiesen werden.

Mittels der vorliegenden Untersuchungen konnten interessante Kandidaten sowohl auf molekularer als auch auf hormoneller Ebene identifiziert werden, die in die Pathogenese des Nierenschadens beim MWF-Stamm involviert sein könnten. Weitere Untersuchungen müssen jedoch genauer die zugrundeliegenden Mechanismen klären.

Abstract

Munich Wistar Frömter (MWF) rats represent a valuable animal model to investigate the development of hypertension and its cardiovascular and renal organ damage, as MWF animals develop mild hypertension and progressive albuminuria. Besides, MWF rats exhibit a sexual dimorphism in kidney damage with a more pronounced degree of albuminuria and glomerulosclerosis in males. A loss of podoplanin expression in podocytes is one possible pathophysiologic mechanism. Furthermore, the MWF strain develops an inborn nephron deficit, which can already be detected at embryonic day (E)15.5.

In this study microarray gene expression analysis of embryonic rat kidneys was performed to identify candidate genes for the impaired nephron induction in MWF. Specific candidates were further analyzed by reverse transcription-qPCR at E15.5 as early-stage kidney, E19.0 as late-stage fetal kidney, and in week 4 when nephrogenesis is completed. Spontaneously hypertensive rats (SHR) were used as reference strain after stage-matching at E16.0 and E19.5, respectively. Furthermore, the effect of testosterone on the development of albuminuria was investigated in male MWF rats. Adult animals were either orchietomized (Ox), or orchietomized and treated with both, testosterone and the androgen receptor antagonist flutamide (OxTF), and compared to sham-operated rats (Sham) by measuring the renal albumin excretion.

Transcriptome analysis revealed 311 transcripts with significant expression differences between MWF and SHR. Seven genes were located on rat chromosome 6 that was previously linked to the development of albuminuria and nephron deficit in the MWF strain. Four genes were significantly upregulated in MWF (*Abcg5*, *Ab1-233*, *Efcab11*, *Gpx2*), and three genes were significantly downregulated (*Fntb*, *Lrrn3*, *Rtn1*). *Gpx2*, encoding the glutathione peroxidase 2, seemed of special interest, as its expression in murine embryonic kidney was already reported.

The testosterone study displayed a progressive development of albuminuria in MWF Sham animals with an albumin excretion of 48.30 ± 6.16 mg/24h in 18 week old rats. After orchiectomy, albuminuria was reduced by more than 50 % compared with MWF Sham. In O_xTF animals testosterone levels were higher after testosterone substitution than in the Sham group. However, androgen receptor blockade with flutamide further suppressed albuminuria to levels of 6.40 ± 1.19 mg/24h.

Furthermore, a molecular link between angiotensin II stimulation and reduced podoplanin expression was identified in cultured human podocytes.

The current study revealed interesting candidates – molecular and hormonal – that could be involved in the pathogenesis of renal damage in the MWF strain. Further investigations are needed to clarify their specific functions and mechanisms.

Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen in den Industrieländern zu den häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2013 starben allein in Deutschland 354.493 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems; dies entspricht 40 % aller Todesfälle [1]. Eine der häufigsten Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist die Hypertonie, an der in Deutschland etwa 44 % der Frauen und rund 51 % der Männer leiden [2]. Hochrechnungen zeigen, dass die Prävalenz von Bluthochdruck von 2012 bis 2030 um weitere 8,4 % steigen wird [3]. Weiterhin erhöht ein Bluthochdruck das Risiko für weitere kardiale und renale Folgeschäden, wie z. B. chronische Nierenerkrankungen [3].

Bereits im Jahr 1988 stellten Brenner *et al.* die Hypothese auf, dass eine reduzierte Nephronzahl eine Hypertonie und einen daraus resultierenden Nierenschaden begünstigen kann [4]. In weiteren Studien wurde der Zusammenhang von niedriger Nephronzahl mit der Entwicklung von Hypertonie, Proteinurie sowie chronischem Nierenschaden bestätigt [5-8]. Sowohl intrinsische (genetische) als auch extrinsische

(umweltbedingte) Faktoren können Einfluss auf die Organentwicklung und damit auf die Nephrogenese haben. So korrelieren z. B. ein geringes Geburtsgewicht, aber auch ein defizienter maternaler Ernährungszustand mit einer reduzierten Nephronentwicklung [9, 10]. Ebenso können Störungen in bekannten Signalwegen wie z. B. Gdnf/Ret oder Wnt die Nierenentwicklung behindern [11-14].

Prämenopausale Frauen sind weniger anfällig gegenüber kardiovaskulären und renalen Erkrankungen [15]. Dies zeigt sich sowohl in der allgemein geringeren Prävalenz als auch in der langsameren Progression der Erkrankungen [16]. Eine Meta-Analyse von 68 Studien zeigte, dass das Geschlecht einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung einer nicht-diabetischen chronischen Nierenerkrankung hat [17]. Männer mit chronischer Nierenerkrankung zeigten hier einen schnelleren Abfall der Nierenfunktion als Frauen. Allerdings blieb unklar, ob ein negativer Einfluss von Testosteron oder ein positiver Einfluss von Östrogen der entscheidende Faktor bei der Krankheitsprogression ist [17]. Dennoch konnte ein sexueller Dimorphismus für kardiovaskuläre und renale Funktion bzw. Erkrankung sowohl in humanen als auch in Tierstudien belegt werden [18-22]. So kann Testosteron über Effekte auf den Blutdruck, aber auch durch Beeinflussung der Funktion von Nierenzellen, wie z. B. Podozyten, einen Nierenschaden verursachen [23]. Es wurde bereits ein Circulus vitiosus beschrieben, bei dem eine glomeruläre Endotheldysfunktion einen Podozytenschaden verursacht, der wiederum den Endothelschaden verstärkt [24].

Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte stellt ein geeignetes hypertensives Tiermodell dar, um die Entwicklung von Bluthochdruck, Albuminurie und reduzierter Nephronzahl zu untersuchen. Zum einen weisen MWF-Ratten einen sexuellen Dimorphismus bezüglich des Nierenschadens auf. MWF-Männchen bilden eine stark ausgeprägte progressive Albuminurie mit zusätzlicher Glomerulosklerose aus, die signifikant höher ist als bei Weibchen [20]. Dennoch entwickeln auch MWF-Weibchen eine leichte Albuminurie, die signifikant höher ist als bei Albuminurie-resistenten spontan hypertensiven Ratten (SHR) [20]. Zum anderen haben MWF-Ratten eine stark reduzierte Nephronzahl, die bei 4 Wochen alten Tieren gegenüber SHR um 27 % erniedrigt ist [25]. Bereits im Embryonalstadium weisen MWF-Tiere eine verminderte Nephrondichte auf [26]. Zwar bilden MWF-Embryos am Entwicklungstag (E)15,5 signifikant mehr Ureterknospen aus als die etwas entwicklungsretardierteren SHR-Tiere an E16,0 (nach „Stage-Matching“), jedoch entwickeln SHR-Tiere signifikant mehr

Glomeruli pro Ureterknospe, sodass insgesamt eine größere Anzahl an Glomeruli entsteht [26].

Auf genetischer Ebene konnte in Vorarbeiten nachgewiesen werden, dass sowohl die Ausbildung der Albuminurie als auch die Anzahl von Glomeruli maßgeblich von genetischen Varianten auf Rattenchromosom (RNO) 6 abhängig sind. So konnte durch den Transfer von SHR-RNO6 in den isogenetischen Hintergrund von MWF (MWF-6^{SHR}) die Albuminurie bei jungen Tieren der 8. Woche vollständig unterdrückt werden [25]. Außerdem zeigt der konsome Stamm MWF-6^{SHR} eine gegenüber SHR normalisierte Nephronzahl [25]. Ein Austausch von RNO8 bei MWF-Tieren (MWF-8^{SHR}) reduzierte die Albuminurie ebenfalls signifikant, hatte dagegen aber keinen Einfluss auf die Nephronzahl [27]. Die genauen molekularen Mechanismen, welche die beeinträchtigte Nephrogenese verursachen, blieben jedoch bisher weitgehend unbekannt [28].

Zielstellung

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Dissertation adressiert.

Studie 1: In Vorarbeiten wurde bei der MWF-Ratte mit spontaner Hypertonie und Albuminurie eine reduzierte Effizienz der frühen embryonalen Nephroninduktion nachgewiesen. Diese ist partiell von genetischen Varianten auf RNO6 abhängig. In Studie 1 sollten mittels fetaler Microarray-Genexpressionsanalysen zunächst Kandidatengene identifiziert werden, die in dem relevanten Genort auf RNO6 lokalisiert und in die vorliegende Pathogenese involviert sind. SHR mit physiologisch normaler Albuminurie und Nephroninduktion dienten als Referenzstamm. Die Kandidatengene wurden an E15,5 als frühembryonales Stadium, an E19,0 als spätfetales Stadium und im Alter von 4 Wochen nach Abschluss der Nephrogenese vergleichend untersucht, um Expressionsunterschiede im Zeitverlauf zu identifizieren.

Studie 2: MWF-Ratten zeigen bezüglich der Albuminurie einen sexuellen Dimorphismus mit einer stärkeren Manifestation und Progression bei männlichen Tieren. Effekte von Testosteron auf den Blutdruck oder die Funktion von Nierenzellen sind bereits bekannt. In Studie 2 sollte der Einfluss von Testosteron auf die Ausbildung der Albuminurie bei männlichen MWF-Ratten analysiert werden. Hierfür wurden die Tiere nach Kastration, Testosteron-Substitution und Androgenrezeptorblockade

vergleichend untersucht. Die Nierenschädigung wurde durch Bestimmung der Albuminausscheidung sowie Messung weiterer renaler Schädigungsparameter ermittelt.

Studie 3: Angiotensin II ist ein bekannter Schädigungsparameter für die Entwicklung von Proteinurie und Nierenschäden. Podozyten spielen bei deren Pathogenese eine wichtige Rolle. In einer humanen Podozyten-Zelllinie sollte der Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Podoplanin (PDPN) sowie microRNA-29b, deren Bedeutung bei pathophysiologischen Prozessen bereits beschrieben ist, untersucht werden. Der Verlust der podozytären PDPN-Expression wurde in Vorarbeiten als frühe pathophysiologische Veränderung bei MWF-Tieren nachgewiesen.

Methodik

Die Methoden sind in den Publikationen [29], [30] und [31] detailliert beschrieben.

Tierstämme und Haltung

Die Rattenstämme MWF und SHR wurden als eigene Kolonien in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz etabliert (MWF/FubRkb, SHR/FubRkb) [32, 33]. In Vorarbeiten wurden die konsomen Stämme MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} durch Markerunterstützte Rückkreuzung gezüchtet [25, 27]. Hierfür wurde das gesamte RNO6 bzw. RNO8 von SHR in den isogenetischen Hintergrund von MWF überführt.

Die Tiere wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen (konstante Raumtemperatur von 22 °C, 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus, freier Zugang zu Wasser und Futter) gehalten. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt (G 0085/10, O 0274/09).

Studie 1: Kandidatengenanalyse für angeborenes Nephrondefizit der MWF-Ratte

Gewinnung embryonaler Gewebe

Männliche und weibliche Ratten wurden in einem Zeitfenster von 2 Stunden terminiert verpaart. Trächtige Ratten wurden unter Isofluran-Narkose durch Herzexzision getötet und anschließend die Embryos zur Gewinnung von Leber- und Nierenproben entnommen. Hierfür wurden die Stämme MWF, MWF-6^{SHR} und MWF-8^{SHR} an E15,5

untersucht. Die leicht entwicklungsretardierten SHR-Embryos wurden nach sogenanntem „Stage-Matching“ an E16,0 vergleichend analysiert [26]. Um Entwicklungsunterschiede durch unterschiedliche Wurfgrößen zu minimieren, wurden nur Würfe mit 9-13 Embryos für die weiteren Versuche verwendet.

Zur Geschlechtsbestimmung wurde das Gen *Sry* (sex determining region Y), welches nur bei männlichen Ratten exprimiert wird, in Leberproben mittels Standard-PCR (Polymerase Kettenreaktion) und gelelektrophoretischer Auftrennung untersucht.

Microarray- und Kandidatengenanalyse

Aus den embryonalen Nieren der Männchen wurde die RNA mittels RNeasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben extrahiert und eine genomweite Expressionsanalyse mittels Microarray-Technologie (GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array; Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK) durchgeführt [26].

Gene auf RNO6 mit einem Fold-Change (FC) $> +1,5$ bzw. $< -1,5$ und einer False Discovery Rate (FDR) unter 5 % wurden per Reverse Transcription-qPCR (RT-qPCR) konfirmiert.

Zur Validierung wurden die Kandidatengene an E15,5, E19,0 sowie im Alter von 4 Wochen mittels RT-qPCR analysiert ($n = 6-8$ pro Stamm). SHR-Tiere wurden nach „Stage-Matching“ an E16,0 und E19,5 vergleichend untersucht.

Die RNA wurde für die pränatalen Stadien aus ganzen Nieren männlicher Tiere mittels RNeasy Micro Kit isoliert. Für die Proben der 4. Woche wurde die RNA-Isolation aus Glomeruli-Präparationen mittels TRIzol Reagenz (Life Technologies GmbH, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Nachfolgend wurden 500 ng Gesamt-RNA von embryonalen Nieren sowie 2 µg RNA von fetalen Nieren und Glomeruli-Präparationen mittels First Strand cDNA Synthesis Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt) in die korrespondierende cDNA umgeschrieben. Abschließend erfolgte die relative Quantifizierung der Genexpression, wobei *Hmbs* (hydroxymethylbilane synthase) als Referenzgen verwendet wurde.

Studie 2: Androgen-abhängige Ausbildung der Albuminurie im MWF-Modell

Kastration und Testosteron-Substitution

Der Einfluss von Testosteron auf die Entwicklung der Albuminurie bei männlichen MWF-Ratten wurde nach Kastration und unter Testosteron-Substitution mit gleichzeitiger Androgenrezeptorblockade untersucht. Hierfür wurde eine Gruppe

beidseitig orchiektomiert (Ox). In einer zweiten orchiektomierten Gruppe wurde Testosteron mittels intraperitonealer (i.p.) Implantation eines Testosteronpropionat-Pellets (150 mg, Freisetzungzeit 90 Tage; Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USA) substituiert und zusätzlich täglich Flutamid (30 mg/kg/d; LKT Laboratories, St. Paul, Minnesota, USA) als Androgenrezeptorantagonist subkutan appliziert (OxTF). Eine dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe (Sham).

Untersuchung der Albuminurie und Nierenschädigung

Blut- und Urinproben wurden im Alter von 12, 14, 16 und 18 Wochen genommen. Der Albumingehalt im 24-Stunden Sammelurin wurde mit Hilfe von Stoffwechsellkäfigen gewonnen und mittels eines Ratten-spezifischen ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ermittelt [25]. Aus den Blutproben wurde die Testosteron-Serumkonzentration bestimmt.

Am Versuchsende in der 18. Woche wurden die narkotisierten Tiere durch Herzexzision getötet und die Nieren zur weiteren histologischen und molekularbiologischen Untersuchung entnommen. Histologisch wurde der Glomerulosklerose-Index (GSI) nach Periodic acid-Schiff-Färbung bestimmt. Weiterhin wurde die Genexpression der Nierenschädigungsmarker *Kim1* (kidney injury molecule 1) und *NGAL* (renal neutrophil gelatinase-associated lipocalin) analysiert.

Studie 3: Regulierung von PDPN in humanen Podozyten

Eine im eigenen Labor etablierte humane Podozyten-Zelllinie wurde für 48 h mit 1 μ M Angiotensin II (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) stimuliert und anschließend die RNA-Expression von *PDPN* und microRNA-29b untersucht. Die Proteinexpression von PDPN wurde mittels semi-quantitativen Western Blot-Analysen bestimmt. Hierfür wurden spezifische Antikörper gegen PDPN (P5374, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) und GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; CB1001, Calbiochem, Darmstadt) zur Beladungskontrolle verwendet.

Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Zusätzlich wurde bei fehlender Normalverteilung der Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Eine Wahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

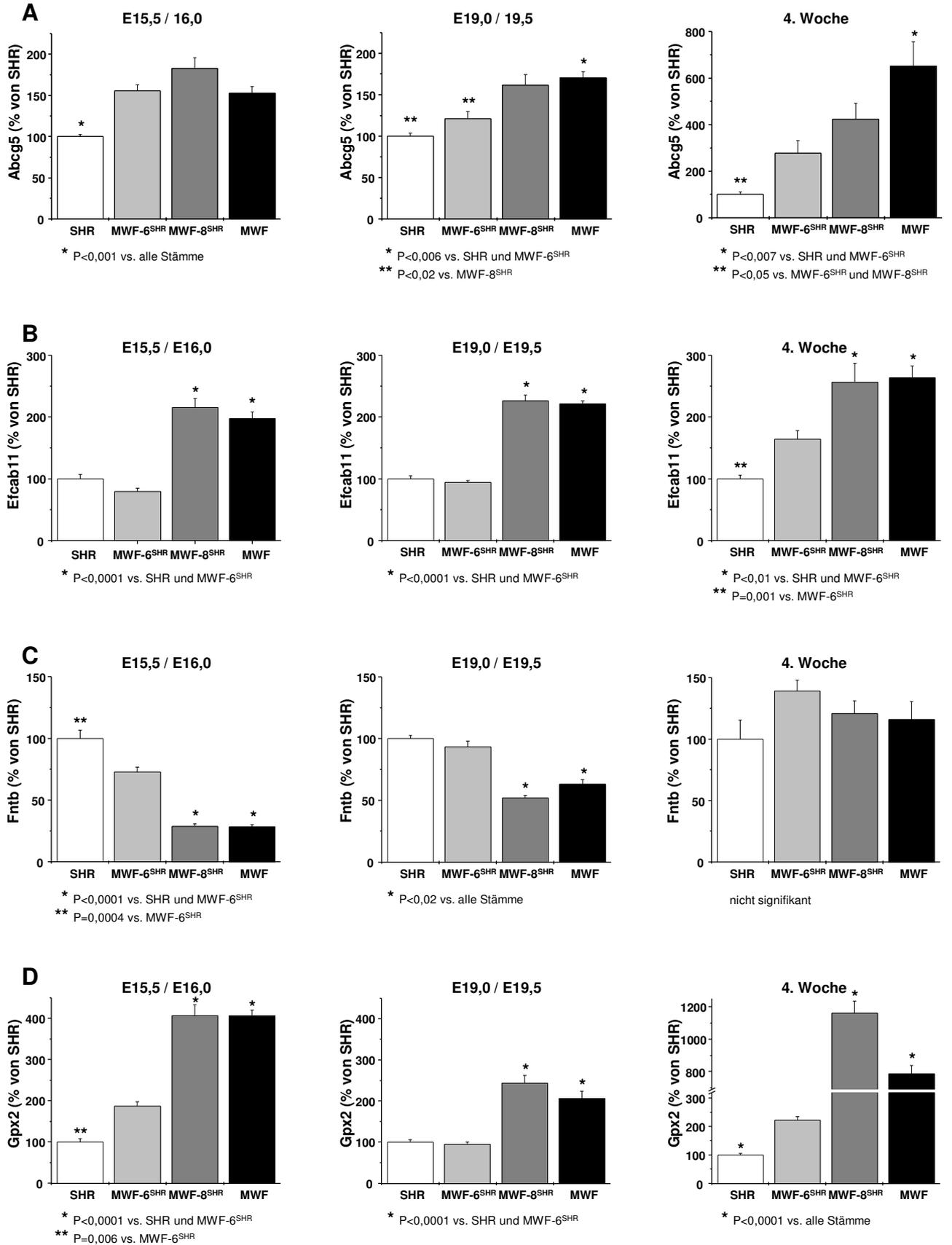
Ergebnisse

Studie 1: Kandidatengenanalyse für angeborenes Nephrondefizit der MWF-Ratte

Die Microarray-Analyse zeigte 311 signifikant differentiell exprimierte Transkripte zwischen MWF und SHR mit einem FC $> +1,5$ oder $< -1,5$ und einer FDR $< 5\%$, darunter 253 bekannte Gene. Sieben dieser Gene lagen auf RNO6, nämlich *Abcg5* (ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 5), *Ab1-233* (LOC500712), *Efcab11* (EF-hand calcium binding domain 11), *Fntb* (farnesyltransferase, CAAX box, beta), *Gpx2* (glutathione peroxidase 2), *Lrrn3* (leucine rich repeat neuronal 3) und *Rtn1* (reticulon 1). Vier Gene waren bei MWF signifikant hochreguliert (*Abcg5*, *Ab1-233*, *Efcab11* und *Gpx2*) und drei Gene waren signifikant herunterreguliert (*Fntb*, *Lrrn3* und *Rtn1*). Diese Gene wurden per RT-qPCR im Alter E15,5/E16,0, E19,0/19,5 und in der 4. Woche bei MWF-, MWF-6^{SHR}-, MWF-8^{SHR}- und SHR-Tieren analysiert (Abb. 1).

Abcg5 war bei MWF-Tieren verglichen mit SHR an allen drei Zeitpunkten signifikant um mehr als 50 % hochreguliert (Abb. 1A). An E15,5 zeigte *Abcg5* noch keine allelische Regulation, aber ab E19,0 war das Gen sowohl bei SHR als auch beim konsomen Stamm MWF-6^{SHR} signifikant niedriger exprimiert als bei MWF. *Efcab11* und *Gpx2* waren bei MWF und MWF-8^{SHR} gegenüber SHR in allen drei Stadien signifikant hochreguliert (Abb. 1B und D). Der konsome Stamm MWF-6^{SHR} wies für *Efcab11* und *Gpx2* ähnliche Expressionswerte auf wie SHR, die signifikant niedriger waren als bei MWF ($P < 0,01$), und zeigte damit eine allelische Regulation. *Ab1-233* war in allen Stämmen und zu allen drei Zeitpunkten so niedrig exprimiert, dass die relativen Genexpressionen nicht berechnet werden konnten.

Auch die herunterregulierten Gene *Fntb*, *Lrrn3* und *Rtn1* konnten mittels RT-qPCR bestätigt werden. *Fntb* zeigte nur in den pränatalen Stadien E15,5 und E19,0 eine signifikant niedrigere Genexpression bei MWF und MWF-8^{SHR} im Vergleich zu SHR und MWF-6^{SHR} (Abb. 1C). In der 4. Woche war kein Expressionsunterschied mehr zwischen den Stämmen zu erkennen. *Lrrn3* und *Rtn1* waren in frühembryonalen MWF E15,5 Nieren signifikant niedriger exprimiert als bei SHR und MWF-6^{SHR} (Abb. 1E und F). Interessanterweise drehte sich das Expressionsmuster in der 4. Woche bei beiden Genen um. Hier wiesen MWF-Tiere signifikant höhere Expressionswerte gegenüber SHR auf.



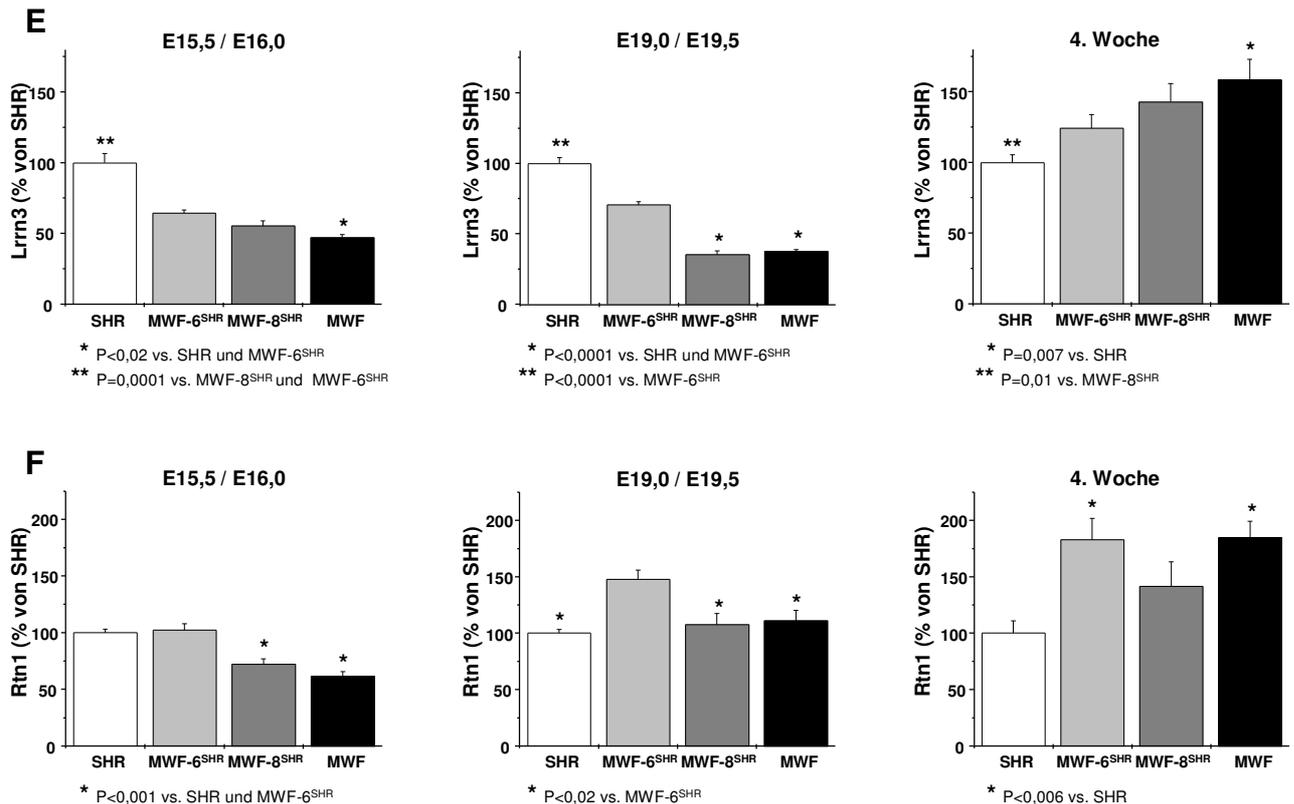


Abbildung 1: mRNA-Expression der Kandidatengene auf Rattenchromosom 6 von SHR (nach Stage-Matching, weiß), konsomen MWF-6^{SHR}- (hellgrau) und MWF-8^{SHR}- (dunkelgrau) sowie MWF-Ratten (schwarz) an Entwicklungstag (E)15,5/E16,0, E19,0/E19,5 und im Alter von 4 Wochen.

Studie 2: Androgen-abhängige Ausbildung der Albuminurie im MWF-Modell

Zunächst wurde die Testosteron-Konzentration im Serum von MWF-Männchen im Zeitverlauf bestimmt. Physiologisch wiesen MWF-Männchen in der 12. Woche Testosteron-Konzentrationen von $9,11 \pm 1,11$ nmol/l auf, die in der 14. Woche auf $14,76 \pm 2,44$ nmol/l anstiegen und anschließend kontinuierlich absanken. Die Kastration bei MWF Ox führte im Vergleich zu Sham-Tieren zu signifikant niedrigeren Testosteron-Serumspiegeln, die im gesamten Beobachtungszeitraum unter 0,2 nmol/l lagen. Nach i.p. Implantation eines Testosteron-Pellets in der OxTF-Gruppe stieg die Testosteron-Konzentration anfangs stark an und lag in der 12. Woche bei $20,33 \pm 7,23$ nmol/l, im weiteren Versuchsverlauf fiel die Testosteron-Konzentration bis zur 18. Woche kontinuierlich, jedoch nicht signifikant ab und lag oberhalb der Konzentrationen in der Sham-Gruppe [30].

Die Albuminausscheidung im Urin in der 18. Woche ist für die Versuchsgruppen in Abbildung 2 dargestellt. MWF Sham-Männchen zeigten wie erwartet eine progressive Albuminurie, die im Alter von 18 Wochen mit 5-fach höheren Werten weitaus stärker war als bei MWF-Weibchen (Abb. 2). Nach Kastration verminderte sich der Grad der

Albuminurie signifikant um mehr als die Hälfte in der MWF Ox-Gruppe. Wurden orchiectomierte Tiere nach Kastration mit Testosteron supplementiert und zusätzlich täglich mit Flutamid als Androgenrezeptorantagonist behandelt (OxTF-Gruppe) reduzierte sich die Albuminurie signifikant gegenüber den anderen männlichen Gruppen ($P < 0,03$) und lag sogar unter den Werten der MWF-Weibchen.

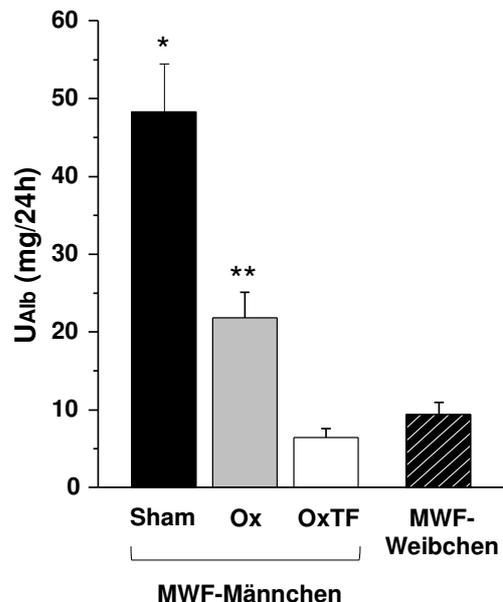


Abbildung 2: Albuminurie (U_{Alb}) von schein-operierten (Sham, schwarz), orchiectomierten (Ox, grau) und orchiectomierten, Testosteron- und Flutamid-behandelten (OxTF, weiß) männlichen MWF-Ratten sowie unbehandelten MWF-Weibchen (schraffiert) im Alter von 18 Wochen. * $P < 0,0001$ vs. Ox, OxTF und MWF-Weibchen; ** $P < 0,03$ vs. OxTF und MWF-Weibchen.

Der schädigende Einfluss von Testosteron konnte in weiteren renalen Untersuchungen bestätigt werden. Die Histologie der Nieren zeigte eine signifikant geringere Glomerulosklerose bei MWF OxTF im Vergleich zu MWF Sham ($P = 0,03$) [30]. Allerdings ergab eine Kastration alleine noch keine signifikante Verbesserung der Histologie. Die renalen Schädigungsmarker *Kim1* und *Ngal* waren auf mRNA-Ebene bei Sham-Tieren signifikant stärker exprimiert als bei OxTF ($P < 0,0004$) [30]. Ox-Tiere wiesen eine deutlich niedrigere Expression der beiden Marker im Vergleich zur Sham-Gruppe auf, die aber nur bei *Kim1* signifikant war ($P = 0,009$).

Studie 3: Regulierung von PDPN in humanen Podozyten

Die Stimulation von humanen Podozyten mit Angiotensin II führte nach 48 h zu einer signifikanten Reduktion der PDPN-Expression auf RNA- und Proteinebene [31]. Im Gegensatz dazu stieg die Expression von microRNA-29b signifikant an. Gleichzeitig induzierte Angiotensin II proapoptotische Prozesse, gemessen in einem Anstieg der

Caspase-3-Aktivität sowie der Translokation von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma der Zellen [31]. Die Hemmung der PDPN-Bildung mittels „small interfering“ (si)RNA resultierte nach Angiotensin II-Stimulation in einer stark verminderten Zellviabilität [31]. Eine vorhergehende Transfektion der Podozyten mit synthetisch hergestellter microRNA-29b führte zu einer Reduktion der PDPN-Expression auf RNA- und Proteinebene [31].

Diskussion

Studie 1: Kandidatengenanalyse für angeborenes Nephrondefizit der MWF-Ratte

In der Micorarray-Studie wurden mehrere Kandidatengene identifiziert, die eine entscheidende Rolle bei der Nephronentwicklung spielen könnten. Gene auf RNO6 waren von besonderem Interesse, da in Vorarbeiten ein bedeutender Quantitativer Trait Locus auf RNO6 mit Einfluss auf Nephronzahl und Albuminurie gefunden wurde [25]. Sieben Gene waren auf RNO6 lokalisiert und zwischen MWF und SHR signifikant differentiell exprimiert: *Abcg5*, *Ab1-233*, *Efcab11*, *Fntb*, *Gpx2*, *Lrrn3* und *Rtn1*.

Die renale Expression von *Gpx2*, einem antioxidativen Enzym, welches H_2O_2 zu H_2O reduziert, wurde im Embryonalstadium bei der Maus bereits beschrieben [34]. Zwischen E16,5 und E18,5 wird *Gpx2* stark im tubulären Epithelium sowie in den Glomeruli des Nierencortex exprimiert [34]. Weiterhin ist *Gpx2* im Wnt-Signalweg reguliert, der bei Wachstum und Differenzierung und damit auch bei der Nierenentwicklung eine Rolle spielt [14]. Interessanterweise war im vorliegenden Modell *Gpx2* bei MWF in allen drei Altersstadien hochreguliert, was einem erhöhten oxidativen Stress in MWF-Nieren widersprechen würde. Es wäre jedoch denkbar, dass eine erhöhte RNA-Expression nur einen Kompensationsmechanismus für eine defiziente Proteintranskription darstellt, was ein vielversprechender Ansatz für weiterführende Untersuchungen ist.

Abcg5 kodiert für einen Effluxtransporter für Cholesterole und Pflanzensterole [35]. Hypercholesterinämie ist ein bedeutender Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, was *Abcg5* zu einem interessanten Kandidaten macht. In der aktuellen Analyse war *Abgc5* bei MWF-Tieren im pränatalen Stadium signifikant hochreguliert. Die Expressionswerte in der 4. Woche waren bei allen Stämmen sehr gering, was eine Bedeutung in der embryonalen Entwicklung bestärkt. Jedoch zeigte ein Knockout (KO) von *Abcg5* in einer *Abcg5/Abcg8*-Doppel-KO-Maus keinen Einfluss auf Fertilität oder Nierenschaden [36].

Fntb ist ein Enzym, das Proteine isoprenyliert. Mijimolle *et al.* zeigten, dass die Farnesyltransferase-Aktivität essentiell für die Zellproliferation während der frühen Embryonalentwicklung ist, da *Fntb*-KO-Embryos nach der Uterusimplantation einer massiven Apoptose unterlagen [37]. Dies deutet darauf hin, dass *Fntb* bei der Nierenentwicklung ebenfalls eine wichtige Rolle spielen könnte. Das Gen war bei pränatalen MWF-Tieren gegenüber SHR signifikant herunterreguliert und könnte daher mit verantwortlich für das Nephrondefizit und den Nierenschaden beim MWF-Stamm sein.

Lrrn3 ist ein Transmembranprotein, welches bei Mäusen hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird [38]. Allerdings ist auch eine Expression in murinen Nieren beschrieben [38]. Die vorliegende Studie konnte die renale Expression bestätigen. Die Daten deuten auf eine wichtige Rolle im Embryonalstadium hin, da *Lrrn3* nur im frühembryonalen Stadium E15,5 bei MWF gegenüber SHR um 53 % herunterreguliert war.

Rtn1 kodiert für das Membranprotein Reticulon 1, das primär im endoplasmatischen Retikulum exprimiert wird und für dessen Formgebung und Struktur verantwortlich ist [39]. Damit könnte *Rtn1* Einfluss auf den intrazellulären Calciumspiegel haben. Auch *Efcab11* ist in Calcium-Signalwege involviert, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellmetabolismus, Zellzyklus, Zelltod und Signaltransduktion spielen [40]. *Efcab11* war bei MWF in allen Stadien höher exprimiert verglichen mit SHR und zeigte eine starke allelische Regulation. *Rtn1* war dagegen bei MWF E15,5 gegenüber SHR um etwa 40 % herunterreguliert. Interessanterweise war wenige Tage später keine differentielle Expression für *Rtn1* mehr messbar; daher könnte speziell das frühembryonale *Rtn1*-Defizit bei MWF für eine verminderte Nephroninduktion verantwortlich sein.

Zu *Ab1-233* ist bisher noch keine bekannte Funktion publiziert. *Ab1-233* war in allen Stämmen und zu allen drei Zeitpunkten so niedrig exprimiert, dass die relative Genexpression nicht berechnet werden konnte. Das deutet jedoch auf eine geringere Wichtigkeit bei der Nierenentwicklung hin.

Die Nephrogenese ist ein komplexer Prozess aus Differenzierung, Wachstum und Verzweigung, der eine Interaktion von epithelialen und mesenchymalen Zellen voraussetzt [41, 42]. Defekte während der Nierenentwicklung können krankhafte Folgen im Erwachsenenalter verursachen, wie Bluthochdruck und chronische renale oder kardiovaskuläre Erkrankungen [42]. Deshalb ist die Erforschung genetischer Ursachen, die eine gestörte Nephrogenese bedingen, von großer Bedeutung. In dieser Studie wurden Kandidatengene identifiziert, die einen entscheidenden Einfluss auf die

Nephroninduktion haben könnten. Weitere Untersuchungen müssen jedoch die genaue Funktion dieser Gene bei der Nierenentwicklung ergründen.

Studie 2: Androgen-abhängige Ausbildung der Albuminurie im MWF-Modell

Ein sexueller Dimorphismus bei der Entwicklung von Bluthochdruck ist für SHR mit höheren Blutdruckwerten bei männlichen als bei weiblichen Tieren bereits beschrieben [18]. Hier wurde der schädigende Einfluss von Testosteron als ursächlich bestätigt. Auch im MWF-Modell ist ein sexueller Dimorphismus bei der Ausbildung einer progressiven Albuminurie dokumentiert [20], allerdings war bisher der kausale Faktor unbekannt.

Die aktuelle Studie zeigt, dass Testosteron über den Androgenrezeptor für die Entstehung und Progression von Albuminurie und Nierenschaden verantwortlich ist. Durch Kastration wurde die Testosteron-Konzentration im Serum stark reduziert, was gleichzeitig zu einer signifikant verminderten Albuminurie bei MWF Ox-Tieren führte. Dennoch können auch nach Kastration noch geringe Mengen Testosteron in anderen Organen gebildet werden, wie z. B. in den Nebennieren [43]; daher konnten auch in Ox-Tieren noch niedrige Testosteron-Serumkonzentrationen gemessen werden, die folglich auch im höheren Alter eine geringe Albuminurie bedingten (Abb. 2) [30]. Dies erklärt auch, weshalb eine Androgenrezeptorblockade durch Flutamid in der OxTF-Gruppe eine noch stärkere Reduktion der Albuminurie trotz erhöhter Testosteron-Serumspiegel verursachte, die auch gegenüber MWF Ox signifikant erniedrigt war (Abb. 2). Durch Antagonisierung des Androgenrezeptors konnte somit der Grad der Albuminurie auf das Niveau der MWF-Weibchen gesenkt werden.

Die Analyse weiterer Nierenschädigungsparameter auf histologischer und molekularbiologischer Ebene bestätigte den schädigenden Einfluss von Testosteron [30]. Auch wenn eine Kastration allein noch keine Verbesserung der Glomerulosklerose bewirkte, so führte eine zusätzliche Androgenrezeptorblockade zu einer signifikanten Reduktion des GSI. Die Untersuchung der tubulo-interstitiellen Nierenschädigungsmarker *Kim1* und *NGAL* demonstrierte ebenfalls eine schädliche Wirkung von Testosteron über den Androgenrezeptor. Die OxTF-Gruppe zeigte die niedrigsten Expressionswerte, wohingegen Ox-Tiere intermediäre Werte aufwiesen. Eine Korrelationsanalyse bestätigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Schweregrad der Albuminurie und *Kim1*- ($r = 0,86$, $P < 0,0001$) bzw. *NGAL*-Expression ($r = 0,64$, $P = 0,002$).

Es gibt mehrere mögliche Mechanismen, wie Testosteron und der Androgenrezeptor einen Nierenschaden bedingen können. Zum einen wäre ein Effekt auf den systemischen Blutdruck und damit auf die glomeruläre Hämodynamik denkbar. Dies jedoch ist im MWF-Modell unwahrscheinlich, da keine Gruppenunterschiede bezüglich des Blutdrucks bei MWF Sham, Ox und OxTF festgestellt wurden [30]. Zum anderen könnte Testosteron die Funktion und Integrität von Nierenzellen wie Mesangiumzellen oder Podozyten stören [23], was in zukünftigen MWF-Studien zu untersuchen wäre. Insgesamt zeigte die Studie, dass der sexuelle Dimorphismus bei der Albuminurieentwicklung beim MWF-Stamm durch Testosteron über den Androgenrezeptor verursacht wird. Die genauen kausalen genetischen und molekularen Mechanismen müssen in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Studie 3: Regulierung von PDPN in humanen Podozyten

Eine Korrelation zwischen dem Grad der Albuminurie und einer verminderten glomerulären Pdpn-Expression ist bei der MWF-Ratte bereits bekannt [44]. Weiterhin ergab eine elektronenmikroskopische Analyse, dass eine Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten mit einer verminderten Pdpn-Proteinexpression einhergeht [44]. Bereits 1997 zeigten Breiteneder-Geleff *et al.*, dass Pdpn bei Nierenerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt [45]. Sie wiesen ebenfalls eine Herunterregulierung des Proteins bei verstärkter Fußfortsatzverschmelzung nach. Die Bedeutung von Pdpn bei Angiotensin II-induzierten pathophysiologischen Prozessen war jedoch bisher nicht bekannt.

Die vorliegende Studie demonstriert einen direkten Zusammenhang zwischen Angiotensin II-Stimulation und daraus resultierender verminderter PDPN-Expression in humanen Podozyten. Angiotensin II induzierte die Expression von microRNA-29b, deren Bedeutung bei fibrotischen und apoptotischen Prozessen bereits beschrieben wurde [46]. Die Angiotensin II-vermittelte Hochregulation von microRNA-29b führte zu einer Verminderung der PDPN-Bildung, welche wiederum mit einer erhöhten Apoptose der Podozyten verbunden war.

Die Studie hat damit einen bedeutenden neuen Pathomechanismus für die Entwicklung der Albuminurie identifiziert. Eine Angiotensin II-Infusions-Studie im MWF-Modell wäre ein interessanter Ansatz für Folgeversuche, um die Bedeutung von PDPN und microRNA-29b *in vivo* zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt – „Gestorbene nach ausgewählten Todesursachen – Gestorbene 2013.“ (Stand September 2015; <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html>)
2. Janhsen K, Strube H, Starker A. Themenheft 43 "Hypertonie". Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Robert Koch Institut 2008
3. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, III, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129:e28-e292
4. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am.J.Hypertens.* 1988; 1:335-347
5. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N.Engl.J.Med.* 2003; 348:101-108
6. Hoy WE, Bertram JF, Denton RD, Zimanyi M, Samuel T, Hughson MD. Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2008; 17:258-265
7. Schreuder MF, Langemeijer ME, Bokenkamp A, Delemarre-Van de Waal HA, Van Wijk JA. Hypertension and microalbuminuria in children with congenital solitary kidneys. *J.Paediatr.Child Health* 2008; 44:363-368
8. Luyckx VA, Bertram JF, Brenner BM, Fall C, Hoy WE, Ozanne SE, Vikse BE. Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. *Lancet* 2013; 382:273-283
9. Hoppe CC, Evans RG, Bertram JF, Moritz KM. Effects of dietary protein restriction on nephron number in the mouse. *Am.J.Physiol. Regul.Integr.Comp. Physiol.* 2007; 292:R1768-R1774
10. Charlton JR, Springsteen CH, Carmody JB. Nephron number and its determinants in early life: a primer. *Pediatr.Nephrol.* 2014; 29:2299-2308
11. Kuure S, Sainio K, Vuolteenaho R, Ilves M, Wartiovaara K, Immonen T, Kvist J, Vainio S, Sariola H. Crosstalk between Jagged1 and GDNF/Ret/GFRalpha1 signalling regulates ureteric budding and branching. *Mech.Dev.* 2005; 122:765-780
12. Pulkkinen K, Murugan S, Vainio S. Wnt signaling in kidney development and disease. *Organogenesis.* 2008; 4:55-59

13. Costantini F. GDNF/Ret signaling and renal branching morphogenesis: From mesenchymal signals to epithelial cell behaviors. *Organogenesis*. 2010; 6:252-262
14. Kipp AP, Muller MF, Goken EM, Deubel S, Brigelius-Flohe R. The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochim.Biophys.Acta*. 2012; 1820:1588-1596
15. Meyer MR, Haas E, Barton M. Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. *Hypertension* 2006; 47:1019-1026
16. Silbiger SR. Raging hormones: gender and renal disease. *Kidney Int*. 2011; 79:382-384
17. Neugarten J, Acharya A, Silbiger SR. Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J.Am.Soc.Nephrol*. 2000; 11:319-329
18. Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31:435-439
19. Denton K, Baylis C. Physiological and molecular mechanisms governing sexual dimorphism of kidney, cardiac, and vascular function. *Am.J.Physiol. Regul.Integr.Comp.Physiol*. 2007; 292:R697-R699
20. Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hänsch J, Wendt N, Kossmehl P, Grimm D, Vetter R, Kreutz R. Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL. *Clin.Sci.(Lond)* 2008; 114:305-311
21. Baylis C. Sexual dimorphism in the aging kidney: differences in the nitric oxide system. *Nat.Rev.Nephrol*. 2009; 5:384-396
22. Bhupathy P, Haines CD, Leinwand LA. Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. *Womens Health (Lond Engl.)* 2010; 6:77-95
23. Verzola D, Gandolfo MT, Salvatore F, Villaggio B, Gianiorio F, Traverso P, Deferrari G, Garibotto G. Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. *Kidney Int*. 2004; 65:1252-1261
24. Fu J, Lee K, Chuang PY, Liu Z, He JC. Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. *Am.J.Physiol. Renal Physiol*. 2015; 308:F287-F297
25. Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hansch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard JR, Kreutz R. Development of overt proteinuria in the Munich Wistar Fromter rat is suppressed by replacement of chromosome 6 in a consomic rat strain. *J.Am.Soc.Nephrol*. 2007; 18:113-121
26. Schulte L, Schulz A, Unland J, Schulz H, Hubner N, Schmidt-Ott KM, Kreutz R. MWF rats with spontaneous albuminuria inherit a reduced efficiency of nephron induction during early nephrogenesis in comparison to SHR rats. *J.Hypertens*. 2012; 30:2031-2038

27. Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR, Wendt N, Huber M, Kreutz R. Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Fromter rat. *Physiol.Genomics* 2008; 35:30-35
28. Cebrian C, Asai N, D'Agati V, Costantini F. The number of fetal nephron progenitor cells limits ureteric branching and adult nephron endowment. *Cell Rep.* 2014; 7:127-137
29. Herlan L, Schulz A, Schulte L, Schulz H, Hubner N, Kreutz R. Novel candidate genes for impaired nephron development in a rat model with inherited nephron deficit and albuminuria. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 2015; 42:1051-1058
30. Herlan L, Unland J, Langer S, Schulte L, Schutten S, Garcia-Prieto CF, Kossmehl P, Fernandez-Alfonso MS, Schulz A, Kreutz R. Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Fromter rats is androgen dependent. *Physiol.Genomics* 2015; 47:281-289
31. Eisenreich A, Langer S, Herlan L, Kreutz R. Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its anti-apoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes. *J.Hypertens.* 2016; 34:323-31
32. Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M. Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J.Hypertens.* 2000; 18:777-782
33. Poyan MA, Siegel AK, Kossmehl P, Schulz A, Plehm R, de Bruijn JA, de Heer E, Kreutz R. Early onset albuminuria in Dahl rats is a polygenetic trait that is independent from salt loading. *Physiol.Genomics.* 2003; 14:209-216
34. Baek IJ, Yon JM, Lee SR, Kim MR, Hong JT, Lee BJ, Yun YW, Nam SY. Differential expression of gastrointestinal glutathione peroxidase (GI-GPx) gene during mouse organogenesis. *Anat.Histol.Embryol.* 2011; 40:210-218
35. Lu H, Klaassen C. Gender differences in mRNA expression of ATP-binding cassette efflux and bile acid transporters in kidney, liver, and intestine of 5/6 nephrectomized rats. *Drug Metab.Dispos.* 2008; 36:16-23
36. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002; 99:16237-16242
37. Mijimolle N, Velasco J, Dubus P, Guerra C, Weinbaum CA, Casey PJ, Campuzano V, Barbacid M. Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis, and tumor development. *Cancer Cell* 2005; 7:313-324
38. Taniguchi H, Tohyama M, Takagi T. Cloning and expression of a novel gene for a protein with leucine-rich repeats in the developing mouse nervous system. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1996; 36:45-52
39. Kaya L, Meissner B, Riedl MC, Muik M, Schwarzer C, Ferraguti F, Sarg B, Lindner H, Schweigreiter R, Knaus HG, Romanin C, Bandtlow CE. Direct association of the reticulon protein RTN1A with the ryanodine receptor 2 in neurons. *Biochim.Biophys.Acta* 2013; 1833:1421-1433

40. Balan S, Iwayama Y, Toyota T, Toyoshima M, Maekawa M, Yoshikawa T. 22q11.2 deletion carriers and schizophrenia-associated novel variants. *Br.J.Psychiatry* 2014; 204:398-399
41. Cain JE, Di Giovanni V, Smeeton J, Rosenblum ND. Genetics of renal hypoplasia: insights into the mechanisms controlling nephron endowment. *Pediatr.Res.* 2010; 68:91-98
42. Chai OH, Song CH, Park SK, Kim W, Cho ES. Molecular regulation of kidney development. *Anat.Cell Biol.* 2013; 46:19-31
43. Labrie F. Adrenal androgens and intracrinology. *Semin.Reprod.Med.* 2004; 22:299-309
44. Ijpelaar DH, Schulz A, Koop K, Schlesener M, Bruijn JA, Kerjaschki D, Kreutz R, de Heer E. Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Fromter rats. *Am.J.Physiol. Renal Physiol.* 2008; 294:F758-F767
45. Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am.J.Pathol.* 1997; 151:1141-1152
46. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol.Genomics* 2012; 44:237-244

Anteilserklärung

Laura Herlan hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Laura Herlan, Angela Schulz, Leonard Schulte, Herbert Schulz, Norbert Hübner, Reinhold Kreutz

Novel candidate genes for impaired nephron development in a rat model with inherited nephron deficit and albuminuria

Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2015

Impact Factor: 2,4

Anteil: 85 Prozent

Tierexperimentelle Arbeiten: Terminiertes Verpaaren, Organ-Präparation

Laborarbeiten: Geschlechtsbestimmung (DNA-Extraktion und PCR); RNA-Extraktion, Umschreiben in cDNA und RT-qPCR

Datenanalyse, Erstellen der Grafiken

Literaturrecherche

Verfassen des Manuskripts

Publikation 2:

Laura Herlan, Johannes Unland, Sebastian Langer, Leonard Schulte, Sabrina Schütten, Concha García-Prieto, Peter Kossmehl, Maria Soledad Fernández-Alfonso, Angela Schulz, Reinhold Kreutz

Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter rats is androgen dependent

Physiological Genomics, 2015

Impact Factor: 2,4

Anteil: 40 Prozent

Laborarbeiten: RNA-Extraktion, Umschreiben in cDNA und RT-qPCR

Datenanalyse, Erstellen der Grafiken

Literaturrecherche

Verfassen des Manuskripts

Publikation 3:

Andreas Eisenreich, Sebastian Langer, Laura Herlan, Reinhold Kreutz

Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its anti-apoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes

Journal of Hypertension, 2016

Anteil: 15 Prozent

Impact Factor: 4,7

Laborarbeiten: Proteinextraktion und Western Blot Analyse

Literaturrecherche

Mitarbeit am Manuskript

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1:

Laura Herlan, Angela Schulz, Leonard Schulte, Herbert Schulz, Norbert Hübner, Reinhold Kreutz.

Novel candidate genes for impaired nephron development in a rat model with inherited nephron deficit and albuminuria.

Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2015; 42:1051–1058.

<http://dx.doi.org/10.1111/1440-1681.12462>

Publikation 2:

Laura Herlan, Johannes Unland, Sebastian Langer, Leonard Schulte, Sabrina Schütten, Concha García-Prieto, Peter Kossmehl, Maria Soledad Fernández-Alfonso, Angela Schulz, Reinhold Kreutz.

Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter rats is androgen dependent.

Physiological Genomics. 2015; 47:281-289.

<http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00008.2015>

Publikation 3:

Andreas Eisenreich, Sebastian Langer, Laura Herlan, Reinhold Kreutz.

Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its anti-apoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes.

Journal of Hypertension. 2016; 34:323-331.

<http://dx.doi.org/10.1097/HJH.0000000000000799>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten

Herlan L, Unland J, Langer S, Schulte L, Schütten S, García-Prieto CF, Kossmehl P, Fernández-Alfonso MS, Schulz A, Kreutz R. Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter rats is androgen dependent. *Physiological Genomics*. 2015 Jul; 47(7):281-9.

Herlan L, Schulz A, Schulte L, Schulz H, Hübner N, Kreutz R. Novel candidate genes for impaired nephron development in a rat model with inherited nephron deficit and albuminuria. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2015 Oct; 42(10):1051-1058.

Eisenreich A, Langer S, **Herlan L**, Kreutz R. Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its anti-apoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes. *Journal of Hypertension*. 2016 Feb; 34(2):323-31.

Abstracts – Vorträge

Herlan L, Schulte L, Kreutz R, Schulz A. Angeborenes Nephrondefizit und Albuminurie bei der Munich Wistar Frömter-Ratte werden durch zwei wesentliche Gene unabhängig voneinander genetisch determiniert. 36. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie und Prävention 2012“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft.

Herlan L, Grabowski K, Schulz A, Kreutz R. Untersuchung eines neuen Kandidatengens für die linksventrikuläre Hypertrophie am Knockout-Maus-Modell. 38. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie und Prävention 2014“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft.
<http://hypertonie2014.de/files/2014/12/Abstractband.pdf>

Abstracts – Poster-Präsentationen

Herlan L, Schulte L, Schulz H, Hübner N, Kreutz R, Schulz A. Identifizierung von Kandidatengenen für angeborenes Nephrondefizit und Albuminurie in einem früh-embryonalen Stadium der Munich Wistar Frömter-Ratte. 37. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie und Prävention 2013“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft.

http://hypertonie2013.rh-kunde.de/files/2013/03/Abstractband_Hypertonie.pdf

Grabowski K, **Herlan L**, Lindner D, Westermann D, Kreutz R. Identification of a novel candidate gene for left ventricular hypertrophy in arterial hypertension and its functional analysis in a new knock out-mouse model. 37. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie und Prävention 2013“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft.

http://hypertonie2013.rh-kunde.de/files/2013/03/Abstractband_Hypertonie.pdf

Schulz A, **Herlan L**, Schmidbauer M, Kreutz R. Fine mapping of two loci within a major albuminuria QTL on rat chromosome 6 that affect both albuminuria and deficient nephron development in the Munich Wistar Frömter rat. Hypertension. 2013; 62: A520.

Schulz A, Schmidbauer M, **Herlan L**, Kreutz R. Identification of transmembrane protein Tmem63c as a novel candidate gene for albuminuria by genetic fine mapping in a genetic rat model. J Hypertension 2013.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Laura Herlan, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen möglicher genetischer Ursachen von renalen Endorganschäden bei hypertensiven Munich Wistar Frömter-Ratten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhold Kreutz danken; er hat mir diese Promotion ermöglicht und mich in dieser Zeit immer gut betreut. Ich habe sehr viel von ihm gelernt.

Außerdem danke ich meinen Betreuerinnen Dr. Angela Schulz und Dr. Katja Grabowski, die mich bei den Projekten unterstützt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein großer Dank gilt auch Claudia Plum, Sabine Wunderlich und Karen Böhme, die mir geduldig alle Methoden erklärt haben und stets beim Arbeiten im Labor behilflich waren. Mit euch hat die Laborarbeit immer Spaß gemacht. Sabine ist leider viel zu früh von uns gegangen – ein großer Verlust für die Arbeitsgruppe –, aber wir haben sie in guter Erinnerung.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Tierpflegern Bettina Bublath und Christiane Priebisch für die hervorragende Tierzucht. Außerdem danke ich Bettina für die Unterstützung und Beratung bei allen Fragen zu Tierzucht, Tierexperimenten oder zum Umgang mit dem LaGeSo.

Ich danke dem gesamten Arbeitskreis der Klinischen Pharmakologie und Toxikologie. Die schönen Mittagspausen mit den Kollegen haben den Arbeitsalltag versüßt und so sind aus Kollegen auch gute Freunde geworden.

Last but not least bedanke ich mich bei meiner Familie, bei der ich immer Halt gefunden habe, wenn ich am Verzweifeln war, und die sich mit mir gefreut hat, wenn ich am Jubeln war. Vielen Dank!