

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

DISSERTATION

Bedeutung der glomerulären Expression von microRNAs bei  
der Munich Wistar Frömter-Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Viktor Kebede

aus Luzk, Ukraine

Datum der Promotion: 09.09.2016

## Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt (Deutsch und Englisch)	1
2	Einleitung	4
2.1	Chronische Niereninsuffizienz	4
2.2	Bedeutung der Albuminurie für die chronische Niereninsuffizienz	5
2.3	MicroRNAs: Aufgabe, Mechanismus und Funktion	7
2.4	MiRNAs und die Niere	9
2.5	Tiermodelle für kardiovaskuläre und renale Erkrankungen	10
2.6	Die MWF-Ratte	11
2.7	Die SHR-Ratte	11
2.8	Identifizierung von Albuminurie-QTL bei der Ratte	12
2.9	Ziele der Arbeit	14
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Chemikalien	16
3.1.2	Kits	16
3.1.3	PCR Master Mix	17
3.1.4	Housekeeping-Gen für die quantitative Realtime-PCR und Kandidatengene	17
3.1.5	Taqman MicroRNA Assays	18
3.1.6	Betäubungsmittel	19
3.1.7	Sonstige Materialien	19
3.1.8	Geräte	20
3.2	Zucht und Haltung des MWF-Rattenstamms	20
3.2.1	Haltung	20
3.2.2	Die Parentaltierstämme MWF und SHR	20
3.3	Präparation und Isolierung der Glomeruli	21
3.4	Extraktion der miRNA aus Glomeruli	21
3.5	cDNA Synthese für Realtime-PCR MicroRNA Assays	23
3.6	Microarray-Profilung für miRNAs	23
3.7	Ermittlung von Referenz-miRNAs für Realtime-PCR Analysen	24
3.8	Realtime-PCR-Analysen der miRNAs	24
3.9	Differentielle Genexpressionsanalyse der Kandidatengene <i>Smad3</i> und <i>Tgfb1</i>	25
3.9.1	RNA Isolation	25
3.9.2	cDNA-Synthese für quantitative Realtime-PCR	26
3.9.3	Quantitative Realtime-PCR von <i>Smad3</i> und <i>Tgfb1</i>	26
3.10	Statistische Auswertung	27
3.11	Sequenzierungsanalyse	27
4	Ergebnisse	30
4.1	Microarray-Analyse der miRNAs	30
4.2	Identifizierung von Referenz-miRNAs für quantitative Realtime-PCRs	32
4.3	Konfirmierung der miRNAs	32
4.3.1	miR-21, miR-29b, miR-200a, miR-204 und miR-301a	32
4.3.2	miR-15b, miR-106b, miR-192, miR-194, miR-497 und let-7i	36
4.3.3	miR-29a, miR-29c, miR-150 und miR-347	40
4.3.4	miR-200b	43
4.4	Kartierung der miRNAs in Albuminurie-QTL beim MWF-Rattenstamm	43
4.5	Ziel-mRNAs der differentiell exprimierten miRNAs	44
4.6	Die Kandidatengene <i>Smad3</i> und <i>Tgfb1</i>	45

4.7 Sequenzierungsanalyse der bestätigten miRNAs .....	46
5 Diskussion .....	48
6 Abkürzungen .....	59
7 Literaturverzeichnis .....	61
8 Eidesstattliche Versicherung .....	70
9 Lebenslauf .....	71
10 Publikation .....	73
11 Danksagung .....	74

## 1 Abstrakt (Deutsch und Englisch)

Die Munich-Wistar-Frömter (MWF) -Ratte ist ein etabliertes Tiermodell für renale Erkrankungen mit Albuminurie. In vorangehenden Arbeiten konnten in genomweiten Kartierungsuntersuchungen mindestens 11 Quantitative Trait Loci (QTL) für die altersabhängige Entwicklung einer Albuminurie bei MWF-Ratten identifiziert werden. Nachfolgend wurde für wichtige QTL auf Rattenchromosom (RNO)6 und RNO8 eine funktionelle Rolle bestätigt. Für ein besseres Verständnis der Rolle von microRNAs (miRNAs) bei der Albuminurieentwicklung wurde die MWF-Ratte als Tiermodell genutzt. MiRNAs sind kurze, nicht-kodierende Abschnitte im Genom, die in der Lage sind, auf posttranskriptioneller Ebene die Expression von Ziel-mRNAs zu beeinflussen. Als Referenzstamm diente die Spontan Hypertensive Ratte (SHR), welche bei systolischen Blutdrücken bis zu 180 mmHg eine geringe, physiologische Albuminurie aufweist.

Zur Erfassung differentiell exprimierter miRNAs wurde ein Microarray-Profilung bei MWF- im Vergleich zu SHR-Ratten durchgeführt. Für die Analysen wurde miRNA aus isolierten Glomerulipräparaten der 8. und 24. Woche zwischen MWF- und SHR-Ratten vergleichend untersucht. Die Bestätigung der identifizierten miRNAs erfolgte über quantitative Realtime-PCR, bei der miRNAs mit einer signifikant unterschiedlichen Expression im Zeitverlauf und zwischen den Stämmen analysiert wurden.

In einem ersten Screening-Experiment wurden im Glomerulum der MWF- und SHR-Ratte 16 differentiell exprimierte miRNAs identifiziert, die im Zeitverlauf zwischen MWF- oder SHR-Ratten signifikant unterschiedliche Expressionsmuster zeigten. Nachfolgend konnten 15 miRNAs über eine Validierungsanalyse bestätigt werden. Von diesen zeigten miR-21, miR-29b, miR-200a, miR-204 und miR-301a im Altersverlauf bei MWF oder SHR einen signifikanten Expressionsanstieg bzw. -abfall im Vergleich zu gleichbleibenden und damit altersunabhängigen Expressionsspiegeln des jeweils kontrastierenden Stamms. Für miR-15b, miR-106b, miR-192, miR-194, miR-497 und let-7i wurden bei jeweils beiden Stämmen sich gleichsinnig verändernde Expressionsspiegel im Zeitverlauf ermittelt, wobei sich die Differenz der Expression zwischen beiden Stämmen der einzelnen miRNAs signifikant unterschiedlich darstellte. MiR-29a, miR-29c, miR-150 und miR-347 wiesen eine beim MWF- und SHR-Stamm

signifikante Expressionveränderung im Zeitverlauf auf, wobei kein Unterschied zwischen den Stämmen vorlag. Interessanterweise kartieren miR-204 und miR-106b in Albuminurie-QTL auf RNO1 bzw. RNO12, wohingegen die restlichen miRNAs außerhalb von Albuminurie-QTL der MWF-Ratte lokalisiert sind.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals spezifische miRNAs in der Niere der MWF-Ratte nachgewiesen werden, die möglicherweise einen Einfluss in der Entwicklung der Albuminurie haben und im Zusammenhang mit Nierenerkrankungen, wie zum Beispiel der renalen Fibrose, stehen. Die Ergebnisse liefern eine gute Basis für weiterführende Studien, um in Zukunft neue Therapieformen für Nierenerkrankungen entwickeln zu können. MiRNAs haben zudem das Potential als diagnostischer Biomarker zur Früherkennung von renalen Erkrankungen eingesetzt zu werden.

The inbred Munich Wistar Frömter (MWF) rat strain is a suitable inbred rat model to study the genetic basis of albuminuria and kidney diseases. At least 11 quantitative trait loci (QTL) for the development of urinary albumin excretion (UAE) have been identified in previous genetic mapping studies. Furthermore, a functional role of important albuminuria QTL on rat chromosome (RNO)6 and RNO8 has been previously confirmed. The MWF model was utilized to analyze the role of microRNAs (miRNAs) in the development of albuminuria. MiRNAs are small, non-coding sequences that post-transcriptionally regulate gene expression by pairing to target-mRNAs, thereby inducing translational repression or mRNA degradation. The Spontaneously Hypertensive Rat (SHR), which develops spontaneous hypertension in early life, served as a reference strain with low UAE. A genome-wide analysis was conducted to detect miRNAs in the kidney with an age-dependent effect on albuminuria development, which map in known QTL or regulate target-mRNAs within the QTL.

Microarray profiling was used to detect differentially expressed miRNAs, which were confirmed with quantitative Realtime-PCR. MiRNA was extracted from glomeruli of MWF and SHR rats aged 8 and 24 weeks. Microarray profiling determined 16 differentially expressed miRNAs that show a significantly differential pattern of expression with age between both strains. In total 15 miRNAs were subsequently confirmed with validation analysis. MiR-21, miR-29b, miR-200a, miR-204 und miR-301a show a significant increase or decrease in expression with age in MWF or SHR in comparison to constant levels of expression regarding the respectively contrasting

strain. MiR-15b, miR-106b, miR-192, miR-194, miR-497 und let-7i appear to have concordant changes in expression levels with age regarding both strains. However the difference in expression for each strain differs significantly. MiR-29a, miR-29c, miR-150 und miR-347 display significant differences regarding expression levels with age for MWF and SHR, but no significant difference between both strains. MiR-204 und miR-106b appear to map in albuminuria QTL on RNO1 respectively RNO12.

For the first time specific miRNAs have been identified in the kidney of MWF rats, that possibly influence the development of albuminuria and are linked to kidney diseases such as renal fibrosis. In the future, a better understanding of pathways and miRNAs regarding kidney diseases could lead to the development of new forms of drug therapy. Furthermore, miRNAs could be utilized as diagnostic biomarkers for early stages of renal diseases.

## 2 Einleitung

### 2.1 Chronische Niereninsuffizienz

Die Niere ist paarig angelegt und besteht in ihrer kleinsten Baueinheit beim Menschen aus jeweils bis zu etwa einer Million Nephronen (Benninghoff et al., 2008). Die Nephrone setzen sich zusammen aus den Nierenkörperchen, die die Glomeruli und die Bowmansche Kapsel beinhalten, und dem Nierentubulus. Das Organ erfüllt wichtige und komplexe Aufgaben im Körper wie die Regulation der Salz- und Wasserausscheidung durch Resorption für eine Homöostase von Volumen und Osmolalität des Extrazellularraums. Des Weiteren kontrolliert die Niere das Gleichgewicht vom Säure-Basen-Haushalt sowie der Ionenkonzentrationen. Zu den weiteren Aufgaben gehört die exkretorische Funktion, die Elimination von retinierten harnpflichtigen Substanzen wie Harnstoff und die Sekretion von beispielsweise Erythropoetin, Renin, Vitamin D und Prostaglandinen.

Eine chronische Verschlechterung der Nierenfunktion hat somit Einfluss auf diverse Regulationskreise und erhebliche Konsequenzen für den gesamten Organismus. Eine Nierenfunktionsbeeinträchtigung kann in einer chronischen Niereninsuffizienz resultieren. Diese wird definiert als eine Erniedrigung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) auf unter  $60 \text{ ml}/1,73 \text{ m}^2$  über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten sowie Zeichen einer Schädigung der Nieren wie zum Beispiel einer Albuminurie (Eckardt et al, 2013). Die Albuminurie stellt dabei den wichtigsten Risikofaktor für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko dar.

Die progressive Nierenverschlechterung führt letztendlich zu einem terminalen Nierenversagen, bei der die Dialyse als Nierenersatzverfahren im Vordergrund steht. Junge Erwachsene, die sich lange Zeit einer Hämodialyse unterziehen, haben eine 10-fach erhöhte Prävalenz einer Arteriosklerose als Gleichaltrige mit normaler Nierenfunktion (Goodman et al., 2000). Es wurde festgestellt, dass chronisches Nierenversagen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert ist (Tonelli et al., 2006).

Ein chronisches Nierenversagen kann aus vielfältigen Gründen entstehen, wobei die diabetische Nephropathie mit 35 % führend ist, gefolgt von primären und sekundären Glomerulonephritiden mit 15 % und polyzystischen Nierenerkrankungen bis 10 %

(Herold, 2014). Eine chronische Niereninsuffizienz führt zu einer Schädigung der Glomeruli, die durch eine Hyperfiltration und durch Hypertrophie versuchen, die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion zu gewährleisten (Noone & Licht, 2014).

Das United States Renal Data System liefert Zahlen zu dem Ausmaß der Fälle vom terminalen Nierenversagen (U.S. Renal Data System, USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013.). In den USA betrug die Inzidenz einer terminalen Niereninsuffizienz im Jahr 2011 357 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner, wobei zum 31. Dezember 2011 430.273 Patienten unter Dialysetherapie waren und 185.626 erfolgreich nierentransplantiert wurden. Die Prävalenz des terminalen Nierenversagens lag bei 1.901 Fällen pro Million Einwohner und stieg im Zeitraum von 2000 bis 2011 um 26 %. Die Gesamtausgaben, die durch terminales Nierenversagen in den USA im Jahr 2011 entstanden sind, lagen bei über 34,3 Milliarden Dollar. Die wachsende Prävalenz und die enormen Kosten verdeutlichen die Bedeutung der chronischen Niereninsuffizienz für das Gesundheitssystem weltweit.

Trotz der umfassenden Therapiemaßnahmen wie Blutdruckeinstellung, Gabe von ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorblocker bleiben kardiovaskuläre Komplikationen der führende Grund für Morbidität und Mortalität bei chronisch Nierenerkrankten (Lambers Heerspink & de Zeeuw, 2013). Es liegt eine inverse Beziehung zwischen chronischer Niereninsuffizienz und koronarer Herzkrankheit vor (Budoff et al., 2011). Dies zeigt die große Bedeutung von weit umfassenden Forschungen zur Ergründung der pathogenetischen und pathophysiologischen Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz, um eine zielgerechte und kausale Therapie entwickeln zu können.

## **2.2 Bedeutung der Albuminurie für die chronische Niereninsuffizienz**

In der Niere wird zur Harnbildung ein albuminfreies Ultrafiltrat in den Glomeruli der Nierenkörperchen produziert, welches als Primärharn in den proximalen Tubulus übergeht. Der glomeruläre Filter, bestehend aus Kapillarendothel, Basalmembran und Podozyten, besitzt eine gewisse Permselectivität. Das bedeutet, dass die Filtration von Größe, Ladung und Form der passierenden Moleküle abhängig ist. Negativ geladene Moleküle wie zum Beispiel Albumin werden physiologischerweise durch die negativ geladene Glykokalix auf der Endothelseite von einer Passage abgehalten. Kommt es zu



einer Schädigung des glomerulären Filterapparats durch beispielweise Diabetes mellitus oder arterielle Hypertonie, so wird die Permselectivität gestört. Kleinere Proteine oder negativ geladene Albuminmoleküle passieren den Filter und führen zur Albuminurie bzw. Proteinurie (Pape et al., 2014).

Eine Mikroalbuminurie wird als Albuminausscheidung im Urin mit einem Albumin-Kreatinin-Quotienten zwischen 30 und 300 mg/g definiert. Werte von über 300 mg/g werden als Makroalbuminurie bezeichnet (Gansevoort et al., 2011). In einer Metastudie mit über 1 Million Patienten wurde nachgewiesen, dass Albuminurie ein unabhängiger Risikofaktor für ein terminales Nierenversagen ist (Gansevoort et al., 2011). Dabei wurde festgestellt, dass das Verhältnis zwischen Albuminurie und terminalem Nierenversagen linear im gesamten Albuminuriespektrum ohne jeglichen Schwellwert ist. Somit sind selbst Werte von unter 30 mg/g signifikant mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbunden. Eine lineare Beziehung wurde des Weiteren auch zwischen dem kardiovaskulären Mortalitätsrisiko und Albuminurie festgestellt (Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium 2010). Das relative Risiko steigt um mehr als das Doppelte bei einer Makroalbuminurie an verglichen mit Patienten mit einer unauffälligen Albuminurie. Darüber hinaus ist die Albuminurie mit einem erhöhten Schlaganfallsrisiko bei Patienten über 65 Jahren unabhängig von Diabetes oder arterieller Hypertonie verbunden (Aguilar et al., 2010). Dies ist möglicherweise auf inflammatorische Prozesse und endotheliale Dysfunktion zurückzuführen, die ebenfalls zu einem erhöhtem Risiko einer koronaren Herzkrankheit führen (Barzilay et al., 2004). Grundlage dieser Entwicklung kann eine interindividuelle Variabilität der endothelialen Funktion sein, die stark mit der Suszeptibilität für Nierenerkrankungen korreliert und dessen genetische Komponente weiter erforscht werden muss (de Zeeuw et al., 2006)

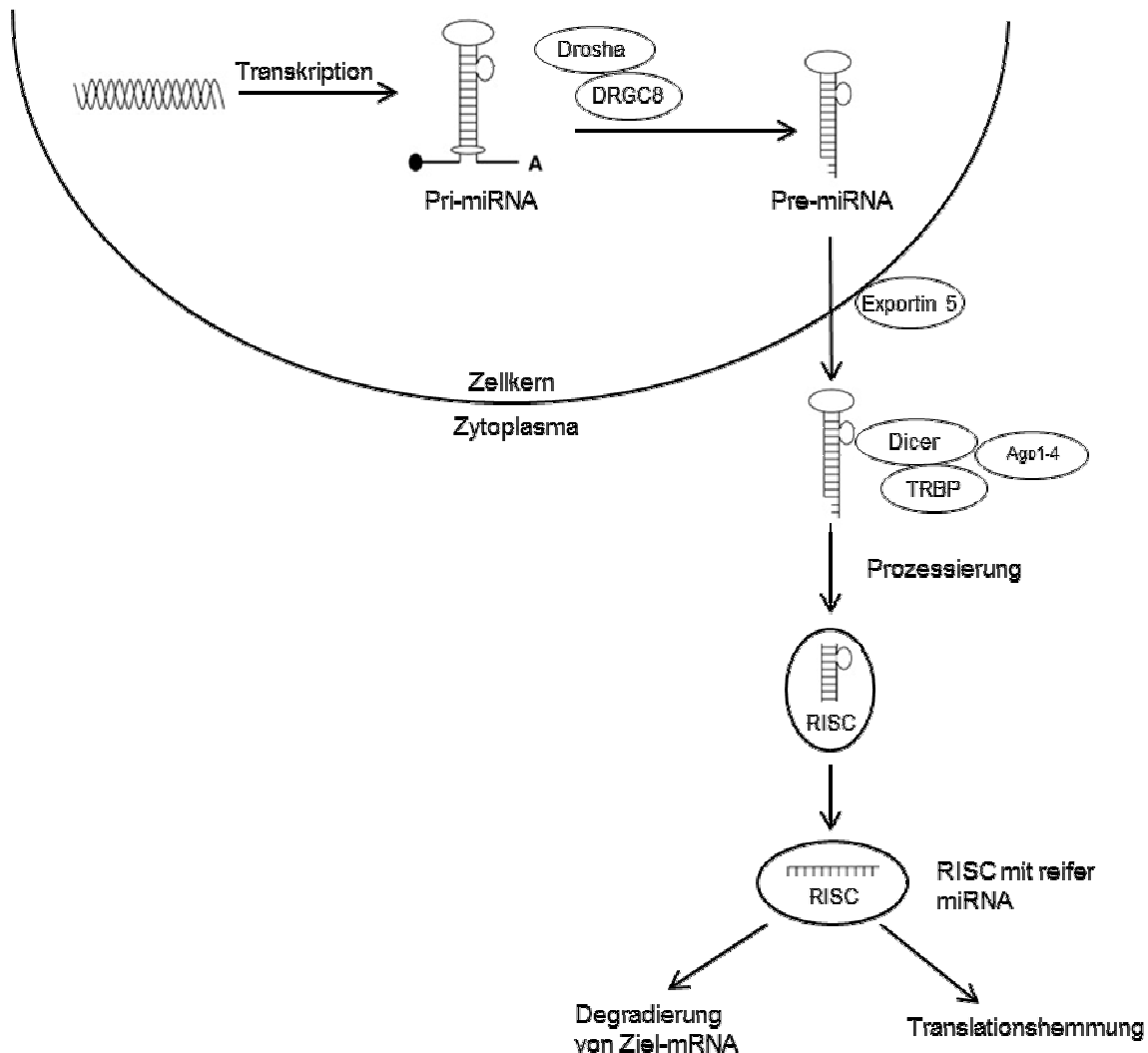
Albuminurie und chronisches Nierenversagen sind bisher unterschätzte Risikofaktoren für ein erhöhtes kardiovaskuläres Mortalitätsrisiko (de Zeeuw et al., 2006). In Zukunft sollte daher der Fokus stärker auf einer Prävention von kardiovaskulären Ereignissen bei Nierenerkrankten liegen und die Erforschung der pathophysiologischen und genetischen Grundlagen der frühen Entwicklung von Nierenschädigungen und deren Auswirkungen intensiviert werden.

## 2.3 MicroRNAs: Aufgabe, Mechanismus und Funktion

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, etwa 22 Nukleotiden lange, nicht-kodierende RNAs, die in der Lage sind auf einer posttranskriptionellen Ebene die Expression von protein-kodierenden Genen zu beeinflussen (Filipowicz et al., 2008). Dieses geschieht durch Bindung der miRNA an Zielsequenzen in der 3'-UTR einer mRNA (Hans et al, 2010). MiRNAs werden als Pri-miRNA (primary miRNAs) transkribiert und anschließend im Nukleus durch das RNase III Enzym Drosha und dem doppelsträngigen RNA Bindungsprotein DGCR8 zu einem haarnadelförmigen, etwa 70 Nukleotiden langen Strukturfragment namens Pre-miRNA (precursor miRNA) weiterverarbeitet (de Fougères, 2007). Pre-miRNAs werden danach von Exportin-5 ins Zytoplasma exportiert und zu doppelsträngigen miRNAs durch ein weiteres RNase II Enzym namens Dicer weiterprozessiert (Blahna & Hata, 2013). Die doppelsträngigen miRNAs binden an ein von vier Argonaute-Proteinen (Ago 1 bis 4) und TAR RNA Bindungsprotein (TRBP). Dies führt zur Bildung eines RISC-Komplexes (RNA induced silencing complex). Innerhalb von RISC wird der Leitstrang aufgenommen und der komplementäre Strang degradiert. Danach kann auf posttranskriptioneller Ebene die Ziel-mRNA degradiert werden oder eine Translationshemmung erfolgen (Blahna & Hata, 2013).

Die primäre Funktion von miRNAs ist die posttranskriptionelle Beeinflussung von Ziel-mRNA (Filipowicz et al., 2008). Eine miRNA kann hunderte Ziel-mRNAs regulieren und eine Ziel-mRNA kann umgekehrt von mehreren miRNAs beeinflusst werden. Bei einer perfekten Komplementarität zwischen miRNA und der Ziel-mRNA spaltet RISC die Ziel-mRNA und unterdrückt somit die Genexpression (Filipowicz et al., 2008). Eine komplette Komplementarität ist jedoch nicht absolut notwendig. Wichtig ist erstens die „seed sequence“, die aus den Nukleotiden 2 bis 8 der miRNA 5'-Sequenz besteht, über welche die miRNA mittels komplementärer Basenpaarung an die 3'-UTR der Ziel-mRNA binden kann. Diese Bindung kann zur Hemmung der Translation führen oder sogar zur Degradierung der mRNA des Zielgens. Zweitens ist eine Verdickung oder Fehlpaarung innerhalb der zentralen Region des miRNA-mRNA-Komplexes nötig. Drittens muss eine gute Basenpaarung an den Nukleotiden 13 bis 16 der 3'-Region der miRNA bestehen (Filipowicz et al., 2008).

Darüber hinaus können miRNAs die Genexpression durch Spaltung der Zielgen-mRNAs zu P-bodies (processing bodies) regulieren (de Fougères et al., 2007). MiRNAs spielen auch eine Rolle beim sogenannten Gen-silencing durch das Eingreifen in die Promoter-Region von Genen (Kato et al., 2012).



**Abb. 1: Biogenese von miRNAs**

MiRNAs werden im Zellkern von von Drosha und DRGC8 verarbeitet und anschließend von Exportin 5 ins Zytoplasma geschleust. Dicer prozessiert die sogenannte Pre-miRNA und lädt sie auf den RISC-Komplex, wonach eine Ziel-mRNA in der Translation degradiert wird oder eine Translationshemmung erfolgt.

Zurzeit sind beim Menschen 2588 miRNAs bekannt und bei der Ratte 765 miRNAs (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Es wird geschätzt, dass etwa 30 % aller Gene bei Säugetieren durch miRNAs reguliert werden und sie verschiedene zelluläre Prozesse,

zum Beispiel den Zellzyklus oder verschiedene Stoffwechselzyklen beeinflussen (Filipowicz et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass bei einigen Erkrankungen, zum Beispiel hypertensiver Nephrosklerose und Hepatitis C miRNAs dysreguliert sind und somit krankheitsrelevante Genprodukte beeinflussen (Kato et al., 2012). Durch die Identifizierung bzw. Untersuchung von miRNAs in Blut und Urin mittels Microarrays, quantitative PCR-Techniken und Gensequenzierung, stellen miRNAs einen attraktiven Biomarker dar und eine mögliche Therapieoption in Zukunft mittels Antagomirs gegen Erkrankungen wie zum Beispiel der diabetischen Nephropathie, Malignomen und Herzversagen. Als Biomarker könnten miRNAs diagnostisch genutzt werden, um frühzeitig Erkrankungen zu erkennen und Erfolge von Behandlungen zu überprüfen (Mitchell et al., 2008).

## **2.4 MiRNAs und die Niere**

MiRNAs sind essentiell für die Entwicklung und Erhaltung vieler Organe, wie auch der Niere. In tierexperimentellen Versuchen wurde nachgewiesen, dass Mäuse ohne das Enzym Dicer nicht überlebensfähig sind (Bernstein et al., 2003). Mäuse mit podozyten-spezifischer Deletion der Enzyme Dicer oder Drosha zeigten einen glomerulären und tubulären Nierenschaden mit Proteinurie (Zhdanova et al., 2011). Die gewebespezifische Expression von miRNA zu untersuchen ist eine wichtige Möglichkeit, um im Vergleich zum gesunden Referenzgewebe potentielle Expressionsunterschiede im krankhaft veränderten Zustand zu bestimmen und organspezifische Funktionen der miRNAs herauszuarbeiten. Dabei wurde die Rolle von wichtigen miRNAs in den glomerulären Zellen in den vergangenen Jahren in Bezug auf diabetische Nephropathie und Transforming Growth Factor - $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-Interaktionen intensiv erforscht (Kato et al., 2012). Durch ein besseres Verständnis der RNA-Interferenz-Pathways könnten in Zukunft mögliche Therapieziele für renale Erkrankungen bestimmt werden (Putta et al., 2012).

Eine veränderte miRNA-Expression wird beispielweise häufig in Karzinomen der Niere beobachtet (Nakada et al., 2008). Sie können dabei als Onkomir oder auch als Tumorsuppressor agieren. Onkomir sind miRNAs, die mit der Entstehung von Tumorerkrankungen assoziiert werden. Damit könnte sich das miRNA-Profilung, also die gewebespezifische Expression, als ein nützliches diagnostisches Mittel erweisen.

Weiterhin werden verschiedene Erkrankungen der Niere mit miRNAs in Verbindung gebracht, unter anderem bei Menschen die IgA-Nephropathie (Wang et al., 2009). Mit der Erkenntnis, dass miRNAs eine veränderte Expression bei Nierenerkrankungen zeigen, wird die Hypothese gestellt, ob eine Veränderung ihres Aktivitätsgrads für eine wieder physiologische Regulation ihrer Ziel-mRNA sorgen kann (Krutzelfeldt et al., 2005). Hierzu ist es jedoch erforderlich, die Interaktion zwischen miRNAs, mRNAs und den zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen bzw. Pathways näher zu analysieren. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten eine Grundlage für mögliche Therapieoptionen auf miRNA-Ebene darstellen.

## **2.5 Tiermodelle für kardiovaskuläre und renale Erkrankungen**

Kardiovaskuläre und renale Erkrankungen werden in ihrer Pathogenese multifaktoriell durch genetische Ursachen sowie Umweltbedingungen beeinflusst. Neben komplexen Interaktionen ist die genetische Heterogenität beim Menschen bei der Erforschung dieser Erkrankungen ein großes Problem (Cowley et al., 2004). Aus diesem Grund wurden selektiv ingezüchtete Tiere etabliert, bei denen ein zu untersuchender Phänotyp besonders ausgeprägt ist. Dieses wird erreicht, indem konsequent über mindestens 20 Generationen Bruder-Schwester-Verpaarungen zwischen den Tieren mit dem am stärksten ausgeprägten Phänotyp durchgeführt werden. Damit weisen die ingezüchteten Ratten eine fast vollständige genetische Homogenität auf (Ganten et al., 1994). Ratten eignen sich besonders gut als Tiermodell aufgrund einer kurzen Generationsdauer mit einer Tragzeit von 21 Tagen und guten standardisierten und kontrollierbaren Zucht- und Haltungsbedingungen (Kreutz & Hubner, 2002). Mit dieser Zuchtmethodik konnten verschiedene Tiermodelle wie die salz-sensitive Dahl-Ratte (SS), die Buffalo-Ratte (BUF), die spontan hypertensive Ratte (SHR) und die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte zur besseren Erforschung des genetischen Hintergrunds kardiovaskulärer Erkrankungen erfolgreich entwickelt werden (Schulz & Kreutz, 2012). Des Weiteren bieten sich Kreuzungsexperimente sowie genetische Kosegrations- und Kopplungsanalysen zur Identifizierung von Quantitative Trait Loci (QTL) und Kandidatengen an, wie im Fall der MWF-Ratte (Schulz et al., 2002).

## **2.6 Die MWF-Ratte**

Bei der MWF-Ratte handelt es sich um ein gut geeignetes Rattenmodell zur Erforschung von chronischen Nierenerkrankungen. Ursprünglich wurden MWF-Ratten für in vivo Mikropunktionsstudien gezüchtet, da sich eine hohe Anzahl von Glomeruli kapselnah im Cortex der Niere befindet. Die weitere phänotypische Charakterisierung der MWF-Ratten ergab, dass sie eine erhöhte Proteinurie und Albuminurie aufweisen und einen mäßigen arteriellen Hypertonus entwickeln (Kreutz et al., 2000; Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). In Altersverlaufsstudien zeigte sich ein progredienter Anstieg der Albuminurie. Darüber hinaus ist die Nephronanzahl im Vergleich zu nierengesunden Rattenstämmen wie der Spontan Hypertensiven Ratte (SHR) bis zu 30 % vermindert (Schulz et al., 2007). Als weitere phänotypische Merkmale wurden eine leichte Glomerulosklerose (GSI) und renale interstitielle Fibrose (RIF) sowie tubulointerstitielle Schädigungen (TSI) und eine reduzierte Podozytenzahl im Vergleich zu Lewis oder SHR-Ratten festgestellt (Kreutz et al., 2000; Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Obwohl die Nephronzahl bei männlichen und weiblichen MWF-Ratten gleich stark reduziert ist, liegt ein sexueller Dimorphismus vor (Schulz et al., 2008). Die Männchen haben eine signifikant höhere Albuminurie-Ausscheidung und Endorganschädigungen als die Weibchen (Schulz et al., 2008).

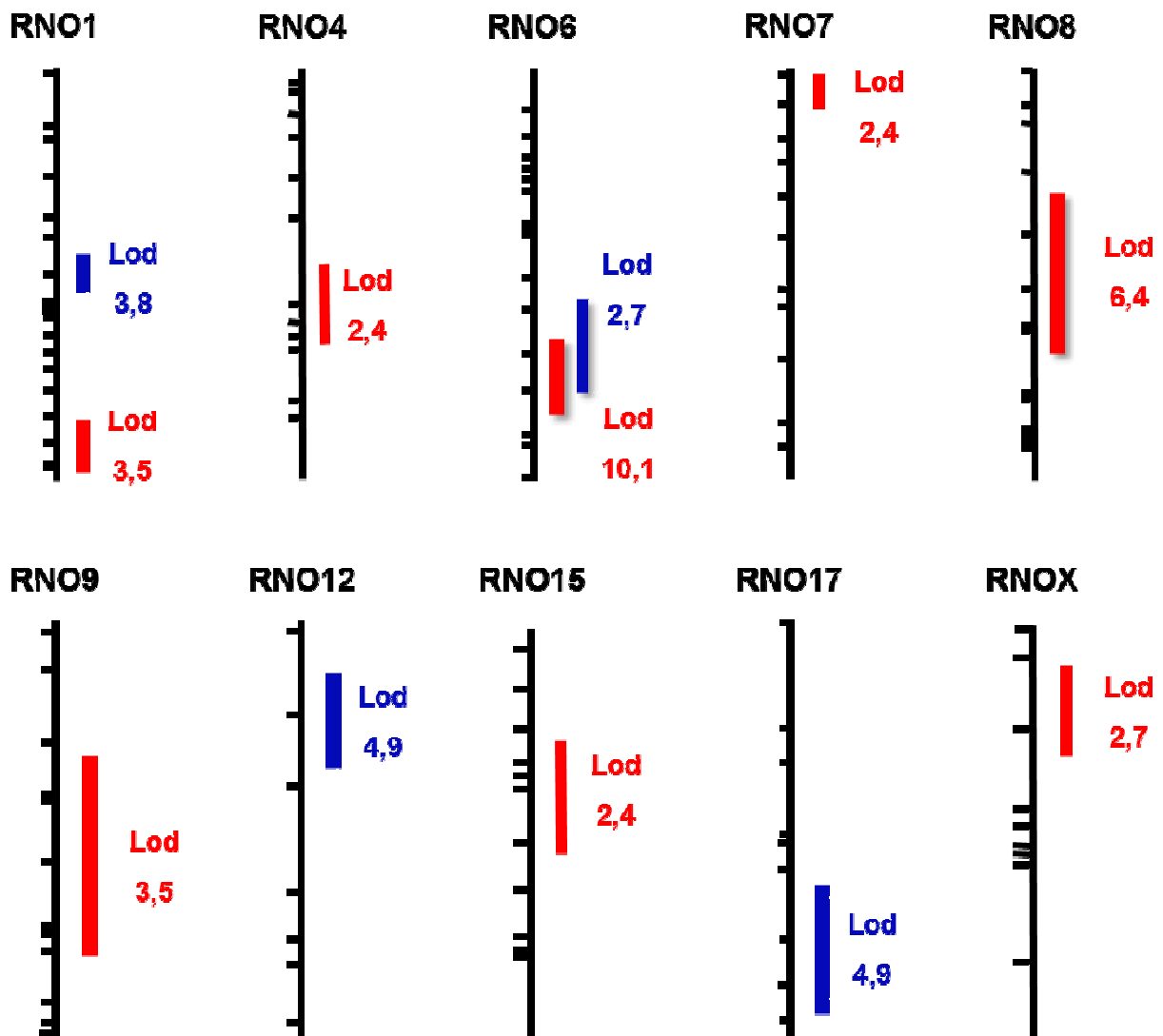
## **2.7 Die SHR-Ratte**

Die SHR-Ratte weist als auffälligstes Merkmal einen starken systolischen Hypertonus von bis zu 180-200 mmHg auf (Pinto et al., 1998). Dieses Rattenmodell wurde 1963 von Okamoto und Aoki aus einem Wistar-Stamm etabliert (Okamoto & Aoki, 1963). Dabei wurden gezielt Tiere mit hohen systolischen Blutdrücken Bruder-Schwester-verpaart. Dieser Stamm wird daher gerne als Rattenmodell für die Erforschung von kardiovaskulären Erkrankungen genutzt. Bei SHR-Ratten liegen trotz eines systolischen Blutdrucks von 180 mmHg in der 24. Woche eine physiologische Albuminurie und keine strukturellen Veränderungen an der Niere vor (Kreutz et al., 2000; Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Zur Identifizierung von Pathomechanismen bietet sich aus diesem Grund die SHR-Ratte als kontrastierender Stamm für die MWF-Ratte an.

## 2.8 Identifizierung von Albuminurie-QTL bei der Ratte

QTL sind definiert als Genorte im Genom, welche statistisch gesehen eine große Wahrscheinlichkeit besitzen, für einen bestimmten quantitativen Phänotyp zu kodieren (Schulz et al., 2002). Für die Identifizierung von QTL auf einem Chromosom der Ratte wird im Rahmen von Kosegregations- und Kopplungsanalysen das Genom mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern analysiert. Mikrosatellitenmarker sind sich wiederholende Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenzen, die sich zum größten Teil im nicht kodierenden Bereich der DNA befinden (Rapp, 2000). Falls ein Mikrosatellitenmarker in die Nähe eines Genlocus kartiert, ist die Wahrscheinlichkeit für eine gemeinsame Vererbung hoch (Rapp, 2000).

Zur Identifizierung von Albuminurie-QTL wurden im Rahmen zweier Kosegregations- und Kopplungsanalysen zum einen MWF- mit hypertensiven, aber nierengesunden SHR-Ratten und zum anderen MWF- mit normotensiven und nierengesunden Lewis-Ratten verwendet. Es wurden bei den Analysen zwischen MWF- und Lewis-Ratten vier Albuminurie-QTL auf vier Rattenchromosomen (RNO) und zwischen MWF- und SHR-Ratten 7 Albuminurie-QTL auf 7 Chromosomen identifiziert, wobei der QTL auf RNO6 bei beiden Analysen kolokalisiert zu sein scheint (Schulz et al., 2002). Die QTL auf Chromosom 6 und 8 weisen den höchsten Lod-Score und damit die höchste Signifikanz auf (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Beide QTL sind zusammen für 33,6 % der Varianz der Albuminausscheidung verantwortlich.



**Abb. 2: Identifizierte Albuminurie-QTL bei der MWF-Ratte.**

Die dargestellten QTL sind das Ergebnis zweier Kosegregations- und Kopplungsanalysen von MWF jeweils mit dem Referenzstamm SHR (roter Balken) bzw. Lewis (blauer Balken). Abgebildet sind die jeweiligen Chromosomen der Ratte mit den genutzten Mikrosatellitenmarkern. Der Lod-Score der einzelnen QTL ist ein Maß für die Kopplungswahrscheinlichkeit.

Der QTL auf RNO6 zeigte schon in der 8. Woche bei der MWF-Ratte eine signifikante Kopplung mit einer Albuminurieentwicklung, welche in der 14. und 24. Woche weiter anstieg (Schulz et.al, 2003). Zur weiteren Erforschung des QTL wurde eine konsome Line MWF-6<sup>SHR</sup> gezüchtet. Dabei wurde RNO6 der nierengesunden SHR-Ratte in den isogenetischen Hintergrund der MWF-Ratte transferiert. Die MWF-6<sup>SHR</sup>-Ratte zeigt in der 8. Woche keine Albuminurieentwicklung und weist auch im Altersverlauf eine signifikante Reduzierung der Albuminurie auf. Außerdem konnte eine signifikante



Reduktion der kapselnahen Glomeruli, eine erhöhte Gesamtzahl der Nephrone und eine geringere renale interstielle Fibrose nachgewiesen werden (Schulz et al., 2007). Um die Bedeutung des Albuminurie-QTL auf RNO8 zu eruieren, wurde ein konsomer MWF-8<sup>SHR</sup>-Stamm gezüchtet. Bei diesem konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Albuminurie in der 8. Woche sowie im Altersverlauf gezeigt werden (Schulz et al., 2008).

## **2.9 Ziele der Arbeit**

Die chronische Niereninsuffizienz und die Albuminurie als Frühzeichen sind bedeutende Risikofaktoren für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko und eine erhöhte Gesamtmortalität. MiRNAs, deren Bedeutung und Erforschung in den letzten Jahren stark zugenommen haben, spielen eine große Rolle in der Regulierung von vielen Genen. Ihre mögliche Schlüsselrolle, unter anderem in der Entwicklung und Pathophysiologie von diversen Nierenerkrankungen, muss weiter ergründet werden, um neue kausale Therapieansätze entwickeln zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es miRNAs in der Niere mit einem altersabhängigen Effekt auf die Albuminurie bei der MWF-Ratte zu identifizieren, die in die bekannten Albuminurie-QTL der MWF-Ratte kartieren. Die differentielle Expression von miRNAs in der Niere von MWF- und SHR-Ratten soll mittels eines Microarray-Profilings bestimmt werden. Identifizierte miRNAs sollen anschließend über quantitative Realtime-PCR-Assays bestätigt werden. Um die Expression der miRNAs quantifizieren und bestätigen zu können, benötigt es einer Referenz-miRNA. Für die quantitative Realtime-PCR wird erst eine geeignete Referenz-miRNA detektiert, welche gleichmäßig in der Niere exprimiert wird. Des Weiteren soll mittels Sequenzierungsanalysen überprüft werden, ob sich bei miRNAs Sequenzvarianten, zum Beispiel in Form von sogenannten single nucleotide polymorphism (SNP) oder INDELs (small insertions and deletions) nachweisen lassen. SNPs sind Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang und können somit Einfluss auf die Transkription und Genregulation von miRNAs haben. Bei INDELs handelt es sich um kleine Insertionen und Deletionen bei Mutationen. Die Ziel-mRNAs der differentiell exprimierten miRNAs sollen über eine Datenbankrecherche ermittelt werden. Eine Auswahl von Kandidatengen, die mittels Literaturrecherche detektiert wurden, werden mit Hilfe von Realtime-PCRs auf ihre

differentielle Genexpression bei MWF- und SHR-Ratten der 8. und 24. Woche überprüft.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
Chloroform	Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol 100 %	J.T. Baker
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Methanol	J.T. Baker
Natriumchlorid	Merck
Nucleasefreies Wasser	Qiagen
RNase® AWAY	Molecular Bioproducts

##### 3.1.2 Kits

<b>Kit</b>	<b>Firma</b>
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas Life Sciences
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Applied Biosystems
miRxplore™ miRNA Isolation Kit	Life Technologies
RNeasy Midi Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems

### 3.1.3 PCR Master Mix

PCR-Master Mix	Firma
TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No UNG	Applied Biosystems
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems

### 3.1.4 Housekeeping-Gen für die quantitative Realtime-PCR und Kandidatengene

Gen	Primersequenz	Firma
<i>HMBS</i>	F: TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA R: TCCAATCTTAGAGAGTGCAGTATCAAGA S: FAM-TTGAAATCATTGCTATGTCCACCACAGG – TAMRA	TIB® Molbiol
<i>Smad3</i>	F: TGCCACTGTCTGCAAGATAC R: CATGCGAGTCAACTGGTAGA	TIB® Molbiol
<i>Tgfb1</i>	F: CCTGCAAGACCATCGACATG R: TGGCGAGCCTTAGTTTGGGA	TIB® Molbiol

*HMBS*, Hydroxymethylbilan-Synthase; *Smad3*, Mothers against decapentaplegic homolog 3; *Tgfb1*, Transforming growth factor beta 1; F, Forward-Primer; R, Reverse-Primer

### 3.1.5 Taqman MicroRNA Assays

<b>MiRNA</b>	<b>Reife miRNA Sequenz</b>	<b>Firma</b>
miR-15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	Life Technologies
miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	Life Technologies
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	Life Technologies
miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	Life Technologies
miR-29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	Life Technologies
miR-29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	Life Technologies
miR-106b	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	Life Technologies
miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	Life Technologies
miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	Life Technologies
miR-194	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	Life Technologies
miR-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	Life Technologies
miR-200b	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA	Life Technologies
miR-204	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	Life Technologies
miR-301a	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC	Life Technologies
miR-324-3p	CCACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	Life Technologies
miR-347	UGUCCCUCUGGGUCGCCCA	Life Technologies
miR-497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGUA	Life Technologies
let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	Life Technologies
let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	Life Technologies

### 3.1.6 Betäubungsmittel

Substanz	Firma
Esketaminhydrochlorid (KetanestS®) 25 mg/ml	Pfizer
Xylazinhydrochlorid (Rompun®) 2 %	Bayer

### 3.1.7 Sonstige Materialien

Artikel	Firma
96-well Optical Reaction Plates	Applied Biosystems
Einwegspritzen aus Kunststoff (2 ml, 5 ml)	Braun
Greiner-Röhrchen 5 ml	Sarstedt
Greiner-Röhrchen 12 ml	Sarstedt
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter)	Altromin
Kanülen	Braun
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfige Typ IV	Ebeco
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
PCR-Tubes 0,2 ml	Biozym
Präparationsbesteck	Aesculap
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Sarstedt
Sieb (71 µm große Poren)	Retsch-GmbH
Sieb (125 µm große Poren)	Retsch-GmbH
Skalpell Gr. 20	Feather
Standardpipetten	Eppendorf
Standardtips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf

### 3.1.8 Geräte

Geräte	Firma
ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Analysenwaage BP 610	Sartorius
Magnetrührer mit Heizfunktion MR 2002	Heidolph
PCR-Cycler	MJ Research
Spektralphotometer Nanodrop 1000	Altromin
VF2 Vortex	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf

## 3.2 Zucht und Haltung des MWF-Rattenstamms

### 3.2.1 Haltung

Die verwendeten Rattenstämme (Genehmigungsnummer O 0052/03 des Landesamts für Gesundheit und Soziales) wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM, Charité - Universitätsmedizin Berlin, CBF) gehalten und etabliert. Die Tiere wurden nach Geschlecht getrennt und mit höchstens vier Tieren in Typ IV Makrolonkäfigen gehalten. Unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen hatten die Tiere stets freien Zugang zu Wasser und Nagerkost mit 0,2 % Natriumchlorid. Die Raumtemperatur betrug 22 °C und mit Hilfe einer automatischen Lichtanlage wurde ein 12-stündiger Tag- und Nachtrhythmus simuliert. Die Tiere wurden über ein Ohrlochmarkierungssystem in fortlaufender Nummerierung gekennzeichnet.

### 3.2.2 Die Parentaltierstämme MWF und SHR

Die Parentaltierstämme MWF und SHR stammen aus den Kolonien der ingezüchteten Stämme MWF/R<sub>kb</sub> und SHR/R<sub>kb</sub> der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Sie wurden 1996 von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Kreutz, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie aus dem MWF/Z<sub>tm</sub> –Stamm des Zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule

Hannover übernommen, als eigene Kolonie MWF/FubRkb (RGD:724569) weitergeführt. Die SHR/FubRkb (RGD:631696)-Ratten wurden 1997 als eigene Kolonie in der Arbeitsgruppe weitergezüchtet und stammen ursprünglich aus einer Kolonie von SHR/Mol-Ratten der Firma M&B, Bomholtvej, Dänemark.

### **3.3 Präparation und Isolierung der Glomeruli**

Alle Tiere wurden im Alter von 8 beziehungsweise 24 Wochen für die Organ- und Gewebeentnahme präpariert. Die Tiere wurden dafür durch eine peritoneale Injektion gewichtsadaptiert mit 87 mg/kg KG S-(+)-Ketamin und 13 mg/kg KG Xylazin narkotisiert. Mit einem Medianschnitt wurde das Abdomen eröffnet. Es wurden beide Nieren entnommen, zur Isolierung der Glomeruli entkapselt und mit dem Skalpell halbiert. Anschließend wurden Kelch und Mark mit der Nagelschere entfernt und die Nierenrinde auf einem Sieb mit 125 µm großen Poren (Retsch GmbH, Haan, Germany) mit 1x PBS gespült. Anschließend wurde zur Isolation der Glomeruli das Filtrat mit 1x PBS durch ein Sieb mit 71 µm großen Poren gedrückt und in Falconröhrchen aufgefangen. Die Glomeruli auf dem Sieb wurden mit 1xPBS abgespült. Danach wurde bei 4 °C bei 5000 U/min für 2 min zentrifugiert, die Flüssigkeit verworfen und das Pellet in 2,0 ml Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert. Die isolierten Glomeruli weisen unter lichtmikroskopischer Darstellung eine geringe Kontamination durch Tubuli auf.

### **3.4 Extraktion der miRNA aus Glomeruli**

Die Extraktion der miRNA aus den Glomeruli der Ratte erfolgte mit dem mirVana™ miRNA Isolation Kit (AM1560). Zur Vorbereitung der Waschlösungen wurden 21 ml 100% Ethanol zur miRNA Wash Solution 1 und 40 ml 100 % Ethanol zu der Wash Solution 2/3 beigefügt. Beide Flascheninhalte wurden gut gemischt.

Zum Gewebeaufschluss im Lysis/Binding Puffer wurden 1 ml Lysis/Binding Puffer in ein Greiner-Röhrchen vorgelegt, das gefrorene Glomerulipellet direkt in die Flüssigkeit gegeben und zur Durchmischung zehnmal mit Hilfe einer 2 ml Spritze durch eine Kanüle gezogen. Das Lysat wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 100 µl miRNA Homogenat Additive hinzugefügt und gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis wurden 1 ml Acid-Phenol:Chloroform



hinzugefügt, für 30 bis 60 Sekunden gevortext und für 5 Minuten bei 10.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die Gewinnung von miRNA wurde durch Glasfaser-Filtersäulen ermöglicht, die in der Lage sind small RNAs anzureichern. Dazu wurden zur wässrigen Phase 333 µl 100 % Ethanol pipettiert und gevortext. 700 µl dieses Lysat/Ethanol-Gemischs wurde auf die Filterkartusche gegeben, für 15 Sekunden bei 10.000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Filtrat in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde der Rest des Lysat/Ethanol-Gemischs auf die gleiche Filterkartusche gegeben und die letzten Schritte wiederholt. Das gewonnene Filtrat wurde zum ersten dazugegeben, gemischt und das Gesamtvolumen mit 1200 µl bestimmt. Zum Filtrat wurden 800 µl 100 % Ethanol bei Raumtemperatur pipettiert, gevortext und 700 µl der Mischung in eine neue Filterkartusche gegeben. Diese wurde für 15 Sekunden bei 10.000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Rest der Mischung wurde in die gleiche Filterkartusche gegeben und die letzten Arbeitsschritte wiederholt.

Anschließend wurden 700 µl miRNA Wash Solution 1 der Filterkartusche beigefügt und für 5 bis 10 Sekunden bei 10.000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl Wash Solution 2/3 in die Filterkartusche einpipettiert und für 5 bis 10 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Danach wurde ein zweites Mal 500 µl Wash Solution 2/3 in die Kartusche pipettiert und die Zentrifugation durchgeführt. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und zum Entfernen der restlichen Flüssigkeit wurde die Filterkartusche für eine Minute zentrifugiert. Darauf wurde der Filter in ein neues 2 ml Sammelgefäß gestellt und zum Eluieren 100 µl RNasefreies Wasser, welches auf 95 °C vorgewärmt war, auf den Filter gegeben. Dieser wurde für 20 bis 30 Sekunden bei 12.000 U/min zentrifugiert. Im Eluat befand sich die extrahierte miRNA für die weitere Verwendung. Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde die Konzentration der RNA ermittelt, in dem die Absorbtion bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und bei 280 nm ( $A_{280}$ ) gemessen wurde. Das Verhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  gibt Aufschluss über die Reinheit der RNA. Anschließend wurde mit nucleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 1 ng/µl verdünnt.

### **3.5 cDNA Synthese für Realtime-PCR MicroRNA Assays**

Für die cDNA-Synthese wurde das Taqman® MicroRNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems genutzt, welches in Verbindung mit spezifischen miRNA Primern der Taqman® MicroRNA Assays RNA in cDNA umwandeln kann. Eine Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion weist ein Volumen von 15 µl auf und besteht aus 7 µl Mastermix, 3 µl spezifischen miRNA Primern und 5 µl der RNA-Probe. Für den RT Mastermix erstellt. wurden pro RT-Reaktion 0,15 µl dNTP mix (100 mM total), 1 µl Multiscribe™ RT enzyme (50 U/µl), 1,5 µl 10x RT Puffer, 0,19 µl RNase Inhibitor (20 U/µl) und 4,16 µl nukleasefreies Wasser pipettiert. Hieraus ergibt sich ein Mastermixvolumen von 7 µl, welches vorsichtig gemischt, herunterzentrifugiert und auf Eis gelegt wurde.

Für jede 15 µl RT Gesamt-Reaktion wurden 7 µl RT Mastermix, 5 µl RNA und 3 µl 5x RT Primer in ein 0,2 ml PCR-Gefäß pipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde das PCR-Gefäß für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reverse Transkriptase Reaktion im Thermocycler erfolgte über 30 min bei 16 °C, 30 min bei 42 °C, 5 min bei 85 °C.

### **3.6 Microarray-Profilung für miRNAs**

Ratten-Glomeruli wurden mit miRXplore™ Microarray Kits über die Firma Milteny Biotec analysiert, um deren miRNA-Expressionsmuster zu bestimmen. Dabei stammten 8 Proben von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche und weitere 8 vom SHR-Stamm der 8. und 24. Woche.

Es wurden nur miRNAs in der Analyse berücksichtigt, die in mindestens einer der Proben über die Signalintensität des Hintergrunds hinaus detektiert werden konnten, um verlässliche Expressionsmuster zu gewährleisten. Dabei wurde jede Probe mit einem künstlichen Set an universellen Referenz (UR) Sequenzen hybridisiert. Diese enthalten 980 synthetische miRNAs bekannter Konzentration auf die abgeglichen wird. Diese Methode erlaubt eine gute Vergleichbarkeit der Proben zwischen und innerhalb der Stämme bei zeitlich entkoppelter Durchführung.

Anschließend wurde das Verhältnis der Signalintensität einer miRNA zum Signal der kohybridisierten UR gebildet (Ratio). Im nächsten Schritt wurden die Re-Ratios gebildet

aus je einem MWF-Ratio und einem SHR-Ratio. Danach konnten die Mittelwerte der Re-Ratios berechnet werden, welche den sogenannten Fold Change widerspiegeln. Der Fold Change ist ein Maß für die differentielle Expressions eines Gens oder einer miRNA.

Laut Hersteller Milteny wird ein Fold Change von  $>2$  oder  $<0,5$  als Schwelle empfohlen, um eine miRNA als signifikant differentiell exprimiert bezeichnen zu können. Zudem wurden miRNAs, die diese Kriterien marginal nicht erfüllen, ebenfalls erfasst.

### **3.7 Ermittlung von Referenz-miRNAs für Realtime-PCR Analysen**

Die Analyse der differentiellen Expression von miRNAs erforderte die Ermittlung einer geeigneten Referenz-miRNA. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zu der vorliegenden Dissertation wurden einerseits die zwei kommerziell erhältlichen Referenz-miRNAs 4.5S RNA H und U87 überprüft und andererseits wurden die Microarray-Chips nach geeigneten Referenz-miRNAs gescreent. Hierfür sind miRNAs geeignet, die nachfolgende Kriterien erfüllen. Die miRNAs sind nicht differentiell exprimiert und weisen eine absolute Signalintensität auf, die in allen 16 Proben über dem Hintergrund liegt. Die relative Standardabweichung (sd/mean) über allen Proben liegt unter 30 % und der Mittelwert des Verhältnis (Signalintensität/Universal Reference) beträgt über 0,5. Ein Anova-Test der Mittelwerte aus den 4 Gruppen (MWF und SHR für jeweils die 8. bzw. 24. Woche) wird durchgeführt, um miRNAs auszuschließen, die sich in den Gruppen untereinander zu sehr unterscheiden. Potentiell geeignete Referenz-miRNAs wurden auf die oben dargestellten Kriterien überprüft und eine für die weiteren Analysen geeignete Referenz-miRNA ausgewählt.

### **3.8 Realtime-PCR-Analysen der miRNAs**

Die im Microarray identifizierten miRNAs wurden mittels Realtime-PCR Analysen bestätigt. Die cDNA und der 20x Primer des Taqman® MicroRNA Assays wurden leicht gevortext und zentrifugiert. Es wurde für jede Reaktion ein Mastermix aus 12 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2x), no UNG, 1,2 µl des 20x Primers des Taqman® MicroRNA Assays und 9,2 µl nucleasefreies Wasser hergestellt. Zu 4,8 µl der cDNA wurden je 70,2 µl des Mastermixes gegeben und je 23 µl davon als Dreifachansatz in eine 96 Well-Platte pipettiert und mit Folie verschlossen und für eine Minute bei 2500 U/min zentrifugiert. Die Realtime-PCR wurde nach folgendem Protokoll

ausgeführt: Ein Zyklus für 2 min bei 50 °C, ein Zyklus für 10 min bei 95 °C, 40 Zyklen für 15 sec bei 95 °C, ein Zyklus für 1 min bei 60 °C.

Nach dem Lauf wurden die Daten mit Hilfe der ABI Prism 7000 Software ausgewertet. Zur Auswertung der Expression wurde die Kontrollgruppe SHR der 8. Woche auf 100 % gesetzt und die anderen Gruppen darauf bezogen.

### **3.9 Differentielle Genexpressionsanalyse der Kandidatengene *Smad3* und *Tgfb1***

#### **3.9.1 RNA Isolation**

Die Glomerulipellets der Ratten der 8. und 24. Woche wurden in flüssigen Stickstoff gestellt. Zur Homogenisation wurde pro Probe ein 12 ml Greiner-Röhrchen mit 4 ml RLT Puffer, zu dem 80 µl 2 M Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt wurde, vorbereitet. Anschließend wurde das Glomerulipellet aus dem flüssigen Stickstoff in das 12 ml Röhrchen überführt. Mit Hilfe einer 5 ml Spritze mit einer langen 0,9 mm dicken Nadel als Aufsatz wurde das Lysat zur Homogenisierung circa 10 bis 20 Mal durch die Nadel gezogen und anschließend das Homogenat in ein 15 ml Falcon Röhrchen gegeben. Danach wurde das Lysat für 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 15 ml Röhrchen überführt. Im nächsten Schritt wurden 4 ml 70 % Ethanol zum homogenisierten Lysat pipettiert und zur Vermeidung von potentiellen DNA-Kontaminationen sofort gevortext bis jedes Präzipitat gelöst war. 4 ml des Gemischs wurden auf die Midisäule gegeben und bei 5000 U/min 5 min lang zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Mit dem Rest des Gemischs wurden die letzten Arbeitsschritte wiederholt. Im Anschluss daran wurde die restliche DNA mittels RNase free DNase Step entfernt. Vor der Nutzung des RNase-Free DNase Sets wurde die DNase I Stocklösung in 550 µl RNase-freiem Wasser gelöst und vorsichtig gemischt. 2 ml des RW1 Puffers wurden auf die Säule gegeben und für 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Für eine Probe wurden 140 µl RDD Puffer aus dem RNase free Kit mit 20 µl DNase Stock gemischt, auf die Säule pipettiert und 15 min stehen gelassen. Danach wurden 2 ml Puffer auf die Säule pipettiert und 5 min stehen gelassen. Anschließend wurde 5 min lang bei 5000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurden 2,5 ml RPE Puffer auf die Säule in einem neuen 15 ml Röhrchen pipettiert und bei 5000 U/min 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden erneut 2,5 ml RPE

Puffer auf die Säule gegeben und bei 5000 U/min 2 min zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule vorsichtig in ein neues 15 ml Tube überführt. Diese wurde mit 150 µl RNase-freiem Wasser eluiert, 1 min stehen gelassen und dann 3 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Das Eluat wurde anschliessend erneut auf die Säule überführt und 3 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Das Eluat wurde in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

### **3.9.2 cDNA-Synthese für quantitative Realtime-PCR**

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas Life Sciences. Die RNA Proben wurden zuerst mit nucleasefreiem Wasser auf 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 10 µl RNA in nucleasefreiem Wasser mit 1 µl Random Hexamer gemischt und zur Hybridisierung im PCR-Cycler für 5 Minuten auf 70 °C inkubiert. Nach der PCR wurde ein Mastermix mit 4,0 µl 5x Reaktionspuffer, 1,0 µl RiboLock RNase-Inhibitor (20 U/µl), 2,0 µl dNTP-Mix (10 mM), 2,0 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) erstellt und dem Ansatz hinzugegeben. Die Reverse Transkriptase Reaktion erfolgte nach folgendem Protokoll: 10 min bei 25 °C, 60 min bei 37 °C, 10 min bei 70 °C und 10 min bei 4 °C. Die cDNA-Konzentration wurde mittels Spektralphotometer überprüft und anschließend jede Probe mit 20 µl nucleasefreiem Wasser verdünnt.

### **3.9.3 Quantitative Realtime-PCR von *Smad3* und *Tgfb1***

Die quantitative Realtime-PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die auf der normalen Polymerase-Ketten-Reaktion basiert und die fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA erlaubt. Bei der PCR wird die zu amplifizierende DNA mit einem Forward und einem Reverse Primer, der Taq-Polymerase, freien Nukleotiden und einem Puffer in Lösung gebracht. Dieses Gemisch wird in der PCR-Maschine in mehreren Zyklen mit spezifischen Temperaturen bearbeitet. Dabei finden pro Zyklus eine Denaturierung der DNA, eine Primeranlagerung an die cDNA und eine Synthese des Amplifikats mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase statt.

Die Quantifizierung wird durch einen fluoreszierenden Farbstoff namens SYBR Green ermöglicht, der mit der DNA interkaliert. Als Bezugsgröße dient das Housekeeping-Gen Hydroxymethylbilan-Synthase (*HMBS*). Bei quantitativen Realtime-PCRs hat sich das Gen *HMBS*, welches an der Hämbiosynthese beteiligt ist, als zuverlässiges Referenz-

Gen für die Niere etabliert (Schulz et al., 2007). Es wird fast gleichmäßig in der Niere exprimiert und ist somit für das Normieren der Daten geeignet. Die relative Expression (rE) von den gesuchten Genen wurde mit Hilfe folgender Gleichungen berechnet:

$$rE_{\text{Smad3}} = \frac{E_{\text{Smad3}}}{E_{\text{HMBS}}}$$

$$rE_{\text{Tgfb1}} = \frac{E_{\text{Tgfb1}}}{E_{\text{HMBS}}}$$

Für jede Reaktion wurde ein Mastermix aus 12,5 µl Power SYBR Green PCR Master Mix, 0,05 µl sense Primer, 0,05 µl antisense Primer und 11,4 µl nucleasefreiem Wasser hergestellt. Zu 3 µl Probe wurden je 72 µl des Mastermixes gegeben und jeweils 23 µl davon als Dreifachansatz in eine 96 Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit Folie verklebt und bei 2500 U/min 1 Minute lang zentrifugiert. Die Realtime-PCR wurde nach folgendem Protokoll ausgeführt: 1 Zyklus à 2 Minuten bei 50 °C, 1 Zyklus à 10 Minuten bei 95 °C, 40 Zyklen à 15 Sekunden bei 95 °C und à 1 Minute bei 60 °C, anschließend einen Zyklus à 15 Sekunden bei 95 °C, 20 Minuten bei 60 °C und 15 Sekunden bei 95 °C. Die Ergebnisse wurden mit der ABI Prism 7000 Sequence Detection Software ausgewertet. Zur Auswertung der Expression wurde die Kontrollgruppe SHR auf 100 % gesetzt und die anderen Gruppen darauf bezogen.

### **3.10 Statistische Auswertung**

Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms PASW Statistics 18. Die Auswertung wurde über eine einfaktorische ANOVA mit post-hoc Test nach Bonferroni durchgeführt. Es wurde zudem der Standardfehler SEM ermittelt.

Die Signifikanzschwelle wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

### **3.11 Sequenzierungsanalyse**

Die Sequenzen der miRNAs wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Norbert Hübner am Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin auf SNPs und INDELS überprüft, die einen Einfluss auf die Regulation der microRNAs haben können. Die Genomkarte der miRNAs bezieht sich auf miRBase Version 20. Genomische DNA

für die SOLiD-Sequenzierung wurde aus der Milz einer MWF Ratte (MWF\_09\_2725, Charité) in einer Konzentration von 1,814 µg/µl präpariert. Die DNA-Bibliotheken für die Sequenzierung wurden nach Standardprotokollen der Firma Life Technologies mit 2,71 µg (1,5 µl x 1,814 µg/µl) genomischer DNA hergestellt. Die DNA-Fragment-Länge wurde mit einem COVARIS S2 Gerät mittels Ultraschall auf 80-130 bp (Fragment-Lauf) bzw. 130-150 bp (Paired-End-Lauf) eingestellt (durch Scheren/shearing). Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration am Nanodrop-Gerät bestimmt. Es wurden 48,8 µl mit 45,22 ng/µl entsprechend 2,2 µg genomischer DNA zur Ligation der Sequenzieradapter eingesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde gel-elektrophoretisch aufgetrennt und die Bande mit der gewünschten Fragment-Größe ausgeschnitten und nachfolgend eluiert. Anschließend wurde die erforderliche DNA-Menge für die Sequenzierung durch PCR-Amplifikation in 3 Zyklen erzeugt. Das Genom der MWF-Ratte wurde in 3 Läufen auf SOLiD-3Plus- und SOLiD-4 Analyzer Geräten sequenziert, danach erfolgten zwei 50 bp Fragment-Läufe und ein 50 bp + 35 bp Paired-End-Lauf. Die resultierenden Sequenzreads aller 3 Sequenzierläufe ergaben eine mindestens 20-fache durchschnittliche Abdeckung des *Rattus norvegicus*-Referenzgenoms (RGSC\_v3.4). Das Alignment der Sequenz-Reads wurde mit dem Burrows-Wheeler-Aligner (bwa) Version 0.5.9 und den Parametern `-c -l 25 -k 2 -n 10` auf einem UNIX Computer durchgeführt. Varianten (SNPs sowie Insertionen und Deletionen kleiner als 10 bp) wurden durch den Vergleich der MWF-Sequenz mit der Referenzgenom identifiziert. Dazu wurde eine modifizierte SAMtools-Pipeline benutzt. Für verwertbare Ergebnisse musste die Basen-Abdeckung zwischen minimal 4-fach und maximal 2000-fach liegen und es wurden nur Sequenzen mit einer eindeutigen genomischen Position herangezogen. Nukleotide mit einem Qualitäts-Score < 30 wurden ebenso verworfen wie zusätzliche identische Sequenz-Reads an der gleichen Position. Jede gefundene Variante muss mindestens 3 Mal beobachtet werden und wenigstens einmal in den ersten 25 Basenpaaren (seed) eines Sequenz-Reads liegen. Die Frequenz der Reads, die eine Variante anzeigen und solchen, die der Referenz entsprechen muss grösser als 2/3 sein, um an einer genomischen Position eine homozygote Variante zu detektieren. Varianten mit niedrigerer Frequenz wurden als Anzeichen möglicher uneindeutiger Sequenz-Duplikation in der inbred MWF-Ratte verworfen, ebenso wie mehr als eine Variante an einer genomischen Position. Die mögliche funktionelle Konsequenz von Varianten wurde mit dem Ensembl Variant Effect Predictor, VEP 2.1, vorhergesagt. Zum Auffinden möglicher SNPs bei MWF oder SHR wurde das

Referenzgenom Brown Norway (Rn34 BN, Prof. Norbert Hübner, MDC Berlin) genutzt und in einem 7 Mio SNPs umfassenden Pool (Affymetrix-Array, Prof. Norbert Hübner, MDC Berlin) nach SNPs der miRNAs gesucht.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Microarray-Analyse der miRNAs

Bei der Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte konnten in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe über genomweite Kartierungsuntersuchungen 11 QTL für die altersabhängige Entwicklung einer Albuminurie identifiziert werden (Schulz et al., 2002). Nachfolgend wurde für wichtige QTL auf Rattenchromosom (RNO)6 und RNO8 eine funktionelle Rolle bestätigt (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Zur Identifizierung genetischer Faktoren bei diesem Tiermodell wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine genomweite Analyse zur Detektion von miRNAs in der Niere mit einem altersabhängigen Effekt auf die Albuminurie vorgenommen, die möglicherweise in die QTL beim MWF-Rattenstamm kartieren.

In einem ersten Screening-Experiment mittels eines Microarrays wurden im Glomerulum der MWF- und SHR-Ratten insgesamt 16 differentiell exprimierte miRNAs mit einem Fold change  $>2$  oder  $<0,5$  identifiziert, die entweder im Altersverlauf zwischen MWF- oder SHR-Ratten signifikant unterschiedliche Expressionsmuster zeigten (Tab. 1 und 2). Beim Vergleich der miRNAs bei MWF-Ratten der 8. Woche und 24. Woche erfüllten 14 miRNAs dieses Kriterium. Der Vergleich bei SHR-Ratten der 8. Woche und 24. Woche führte zur Identifikation von 5 miRNAs mit signifikant unterschiedlichem Expressionsmuster.

**Tab. 1: Vergleich zwischen MWF 8. Woche. und MWF 24. Woche im Microarray.**

<b>MiRNA</b>	<b>Gene Accession</b>	<b>Fold change</b>	<b>Standardabweichung</b>
miR-29b	MI0000862 MI0000864	2,92	1,13
miR-194	MI0000937 MI0000938	2,40	0,40
miR-204	MI0000946	2,17	-
miR-192	MI0000935	2,04	0,80
miR-21	MI0000850	2,03	1,02
miR-29c	MI0000865	1,98	0,67
miR-200b	MI0000944	1,97	0,54
miR-29a	MI0000863	1,96	0,63
miR-200a	MI0000943	1,88	0,48
let-7i	MI0000835	0,67	0,29
miR-15b	MI0000843	0,67	0,28
miR-150	MI0000920	0,66	0,26
miR-497	MI0003724	0,65	0,28
miR-106b	MI0000889	0,61	0,17

**Tab. 2: Vergleich zwischen SHR 8. Woche und SHR 24. Woche im Microarray.**

<b>MiRNA</b>	<b>Gene Accession</b>	<b>Fold change</b>	<b>Standardabweichung</b>
miR-29b	MI0000862 MI0000864	3,49	2,15
miR-29a	MI0000863	3,01	0,85
miR-29c	MI0000865	2,15	1,29
miR-347	MI0000635	2,11	1,12
miR-301a	MI0000593	0,66	0,12

## **4.2 Identifizierung von Referenz-miRNAs für quantitative Realtime-PCRs**

Nichtregulierte Referenz-miRNAs dienen der Kontrolle von Ergebnissen von quantitativen Realtime-PCRs. Bei der Suche nach einer geeigneten Referenz-miRNA untersuchte die Arbeitsgruppe in Vorarbeiten die kommerziell erhältlichen Referenz-miRNAs 4.5S RNA H und U87. Es zeigte sich allerdings eine zu große Streuung der Ct-Werte in der Realtime-PCR beim MWF- und SHR-Stamm. Aus diesem Grund wurden sie nicht als Referenz-miRNA für die Überprüfung der differentiellen Expression der miRNAs eingesetzt. In den Microarray-Analysen konnten zwei miRNAs, miR-16 und let-7a identifiziert werden, welche die in Kapitel 3.7 genannten Kriterien erfüllten. Beide wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation mittels Realtime-PCR hinsichtlich der oben genannten Kriterien überprüft. Let-7a zeigte keine konstante Expression bei den zwei Rattenstämmen in der 8. und 24. Woche. Der SHR-Stamm verzeichnete in der 8. und 24. Woche Ct-Werte von  $22,34 \pm 0,43$  bzw.  $20,69 \pm 0,82$ . Die Realtime-PCR erzielte beim MWF-Stamm der 8. und 24. Woche Ct-Werte von  $21,86 \pm 0,5$  bzw.  $19,68 \pm 0,81$ . Im Gegensatz dazu wies miR-16 durchgehend stabile Ct-Werte bei den MWF- und SHR-Proben der 8. und 24. Woche auf. Bei SHR der 8. und 24. Woche wurden Ct-Werte von  $18,16 \pm 0,37$  bzw.  $18,31 \pm 0,62$  ermittelt. Die Ct-Werte beim MWF-Stamm lagen in der 8. und 24. Woche bei  $18,15 \pm 0,41$  bzw.  $17,65 \pm 0,85$ . Aufgrund der konstanten Ct-Werte wurde miR-16 als Referenz-miRNA für die Konfirmierung der differentiell exprimierten miRNAs ausgewählt.

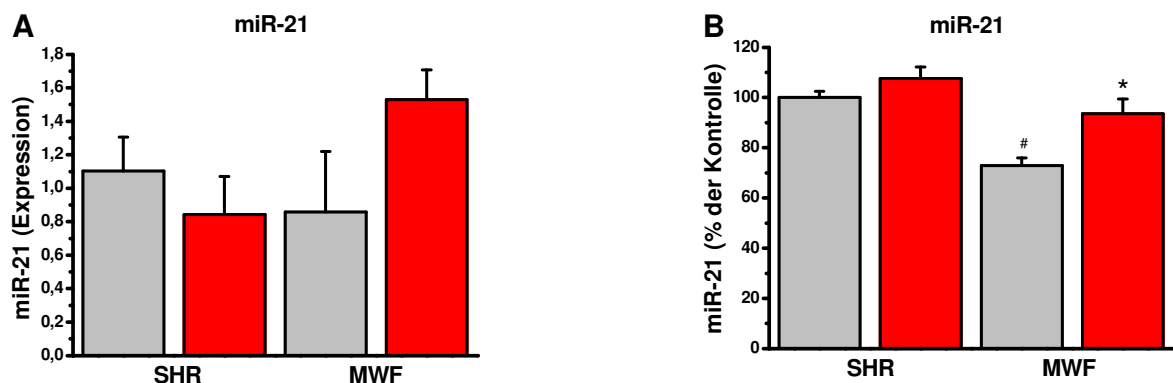
## **4.3 Konfirmierung der miRNAs**

Zur Konfirmierung des Microarrays wurden die 16 identifizierten miRNAs mittels quantitativer Realtime-PCR-Assays überprüft. Dabei konnte bei fünf miRNAs bei MWF, bei einer miRNA bei SHR und bei neun miRNAs bei beiden Stämmen eine signifikante Veränderung der Expression im Zeitverlauf festgestellt werden.

### **4.3.1 miR-21, miR-29b, miR-200a, miR-204 und miR-301a**

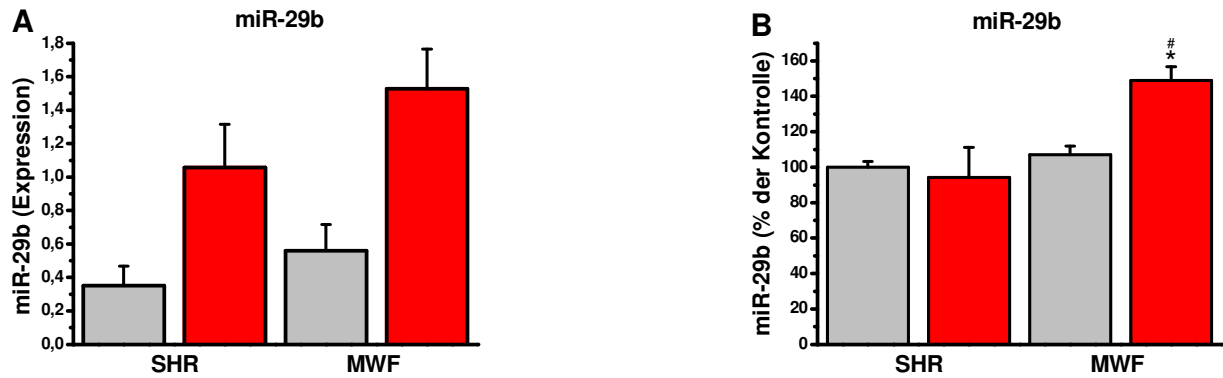
Bei fünf miRNAs, miR-21, miR-29b, miR-200a, miR-204 und miR-301a zeigte sich ein signifikanter Expressionsanstieg bzw. -abfall im Vergleich zu gleichbleibenden und damit altersunabhängigen Expressionsspiegeln des jeweils kontrastierenden Stamms.

Im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche wurde bei miR-21 ein Fold change von  $2,03 \pm 1,02$  ermittelt. Die Konfirmierung mittels Realtime-PCR wies bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche einen signifikanten Anstieg von  $72,9,1 \pm 3,0$  % auf  $93,6 \pm 5,8$  % auf ( $p=0,008$ , Abb. 3). Bei SHR erreichte die Expression von miR-21 in der 8. im Vergleich zur 24. Woche keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3). Die Expression war bei MWF der 8. Woche signifikant niedriger im Vergleich zu SHR der 8. Woche ( $p=0,0004$ , Abb. 3).



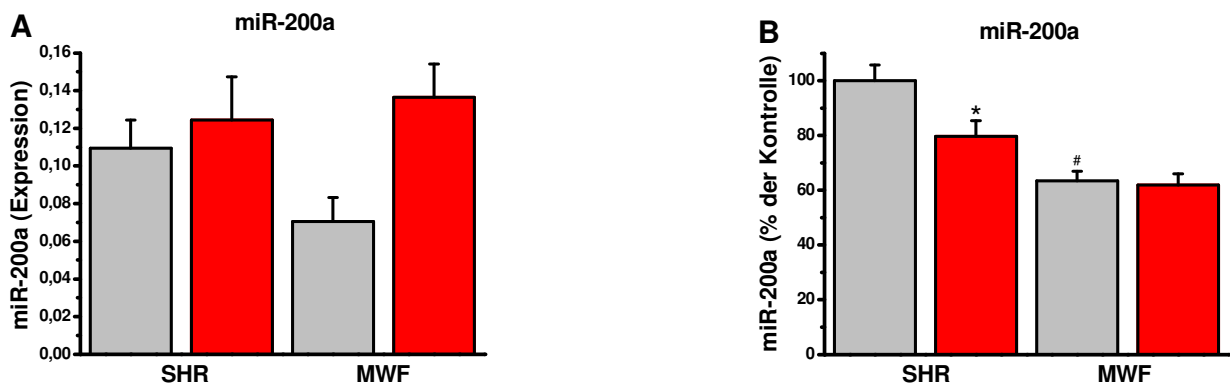
**Abb. 3: Identifizierung von miR-21 über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=2,03 und B, \* $p=0,008$  vs. MWF; # $p=0,0004$  vs. SHR. FC, Fold Change.**

Der Fold change von miR-29b lag bei  $3,49 \pm 2,15$  im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche. Bei der Konfirmierung mittels Realtime-PCR ergab sich bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche ein signifikanter Anstieg um 39 % von  $107,1 \pm 4,9$  % auf  $149,0 \pm 7,8$  % ( $p=0,02$ , Abb. 4). Die Expression von miR-29b bei SHR in der 8. und in der 24. Woche wies keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 4). Zudem war die Expression bei MWF der 24. Woche signifikant höher im Vergleich zu SHR der 24. Woche ( $p=0,002$ , Abb. 4).



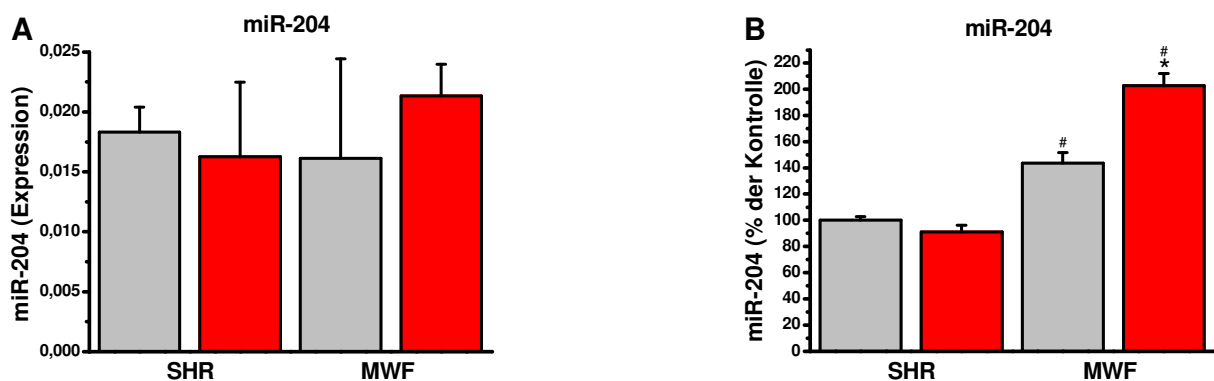
**Abb. 4: Identifizierung von miR-29b über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=3,49 und B, \*p=0,02 vs. MWF; #p=0,002 vs. SHR, 24. Woche. FC, Fold Change.**

Beim Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche wurde bei miR-200a ein Fold change von  $1,88 \pm 0,48$  ermittelt. Bei der Konfirmierung mittels Realtime-PCR zeigte sich aber bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche kein signifikanter Unterschied (Abb. 5). Bei SHR ließ sich bezüglich der Expression von miR-200a in der 8. zu der 24. Woche ein signifikanter Abfall von  $100,0 \pm 5,7$  % auf  $79,7 \pm 5,8$  % feststellen ( $p=0,04$ , Abb. 5). Darüber hinaus zeigte sich bei MWF in der 8. Woche eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zu SHR der gleichen Woche ( $p<0,03$ , Abb. 5).



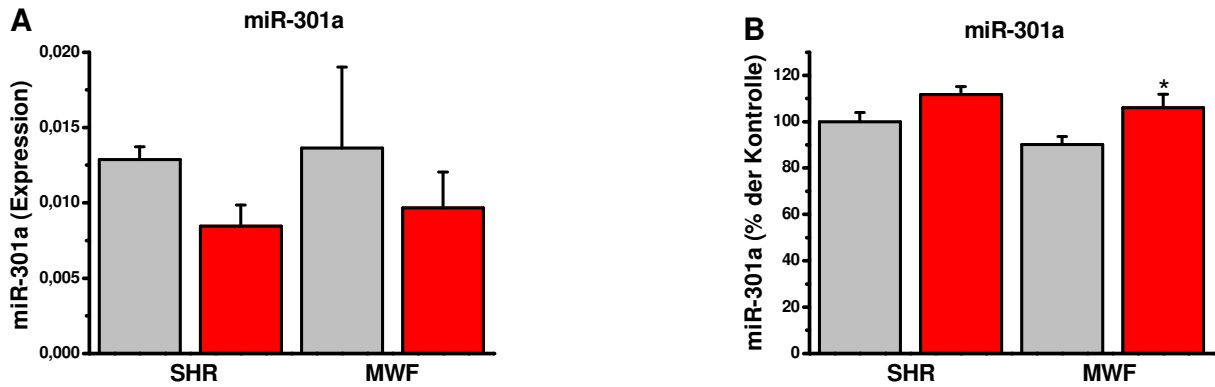
**Abb. 5: Identifizierung von miR-200a über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=1,88 und B, \*p=0,04 vs. SHR; #p<0,03 vs. SHR, gleiche Woche. FC, Fold Change.**

Wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist, konnte beim Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche bei miR-204 ein Fold change von 2,17 detektiert werden. Der MWF-Stamm verzeichnete bei der Konfirmierung im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche einen signifikanten Anstieg um 41 % von  $143,7,1 \pm 8,1$  % auf  $202,8 \pm 9,3$  % der Kontrolle ( $p < 0,0001$ , Abb. 6). Es bestand kein signifikanter Unterschied bei der Expression von SHR in der 8. im Vergleich zur 24. Woche (Abb. 6). Die Expression beim MWF-Stamm war jeweils in der 8. und 24. Woche gegenüber SHR mit 43 % bzw. 223 % signifikant erhöht ( $p < 0,0005$ , Abb. 6).



**Abb. 6: Identifizierung von miR-204 über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=2,17 und B, \* $p < 0,0001$  vs. MWF; # $p < 0,0005$  vs. SHR, gleiche Woche. FC, Fold Change.**

Das Microarray-Profilung von SHR-Ratten der 8. und 24. Woche ergab bei miR-301a einen Fold change von  $0,66 \pm 0,12$ . Bei der Konfirmierung mittels Realtime-PCR unterschieden sich die Werte bei SHR im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche nicht signifikant (Abb. 7). Bei MWF nahm die Expression von miR-301a signifikant von  $90,1 \pm 3,5$  % in der 8. Woche auf  $106,0 \pm 5,9$  % in der 24. Woche zu ( $p < 0,0001$ , Abb. 7).

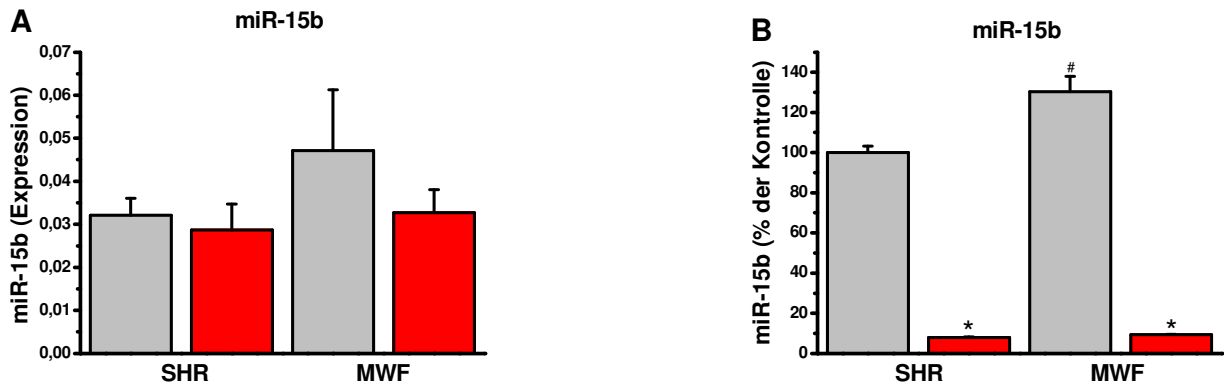


**Abb. 7: Identifizierung von miR-301a über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=0,661 und B, \*p<0,0001 vs. gleicher Stamm. FC, Fold Change.**

#### 4.3.2 miR-15b, miR-106b, miR-192, miR-194, miR-497 und let-7i

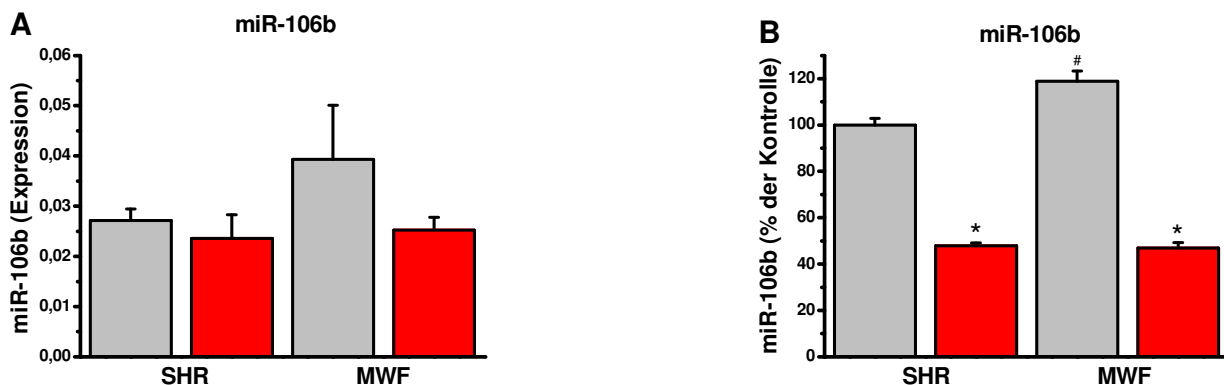
Weitere 6 miRNAs, miR-15b, miR-106b, miR-192, miR-194, miR-497 und let-7i wiesen bei jeweils beiden Stämmen im Zeitverlauf sich gleichsinnig verändernde Expressionsmuster auf, wohingegen die Expressionsdifferenz zwischen beiden Stämmen dieser miRNAs signifikant unterschiedlich ausgeprägt war.

MiR-15b erreichte im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche einen Fold change von  $0,66 \pm 0,28$ . Bei der Konfirmierung beim MWF-Stamm im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche ließ sich ein mehr als 14-facher Abfall von  $130,4 \pm 7,7$  % auf  $9,2 \pm 0,2$  % feststellen ( $p < 0,0001$ , Abb. 8). Bei SHR erniedrigte sich die Expression von miR-15b um mehr als das 12-fache von  $100,0 \pm 3,2$  % in der 8. Woche auf  $7,9 \pm 0,2$  % in der 24. Woche ( $p < 0,0001$ , Abb. 8). Zudem war die Expression bei MWF der 8. Woche gegenüber SHR der gleichen Woche signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ , Abb. 8).



**Abb. 8: Identifizierung von miR-15b über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=0,67 und B, \*p<0,0001 vs. gleicher Stamm; #p<0,0001 vs. SHR, 8. Woche. FC, Fold Change.**

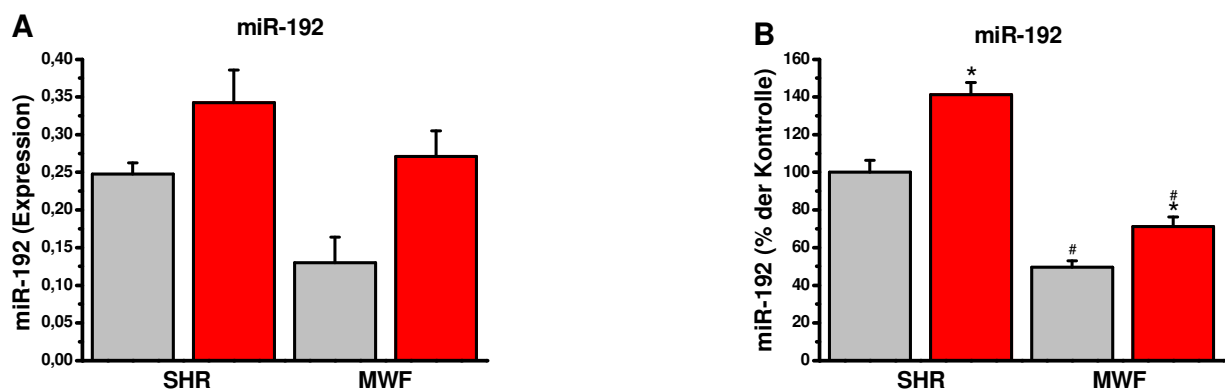
Für miR-106b ergab sich im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche ein Fold change von  $0,61 \pm 0,17$ . Die Konfirmierung mittels Realtime-PCR resultierte bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche mit einem signifikanten Abfall um das 2,5-fache von  $118,9 \pm 4,4$  % auf  $46,9 \pm 2,4$  % ( $p < 0,0001$ , Abb. 9). Die Expression von miR-106b bei SHR fiel signifikant von  $100,0 \pm 2,9$  % in der 8. Woche auf  $47,9 \pm 1,3$  % in der 24. Woche ab ( $p < 0,0001$ , Abb. 9). Die MWF-Ratten der 8. Woche verzeichneten eine signifikant höhere Expression gegenüber SHR der 8. Woche ( $p < 0,0005$ , Abb. 9).



**Abb. 9 : Identifizierung von miR-106b über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=0,61 und B, \*p<0,0001 vs. gleicher Stamm; #p=0,0005 vs. SHR, 8. Woche. FC, Fold Change.**

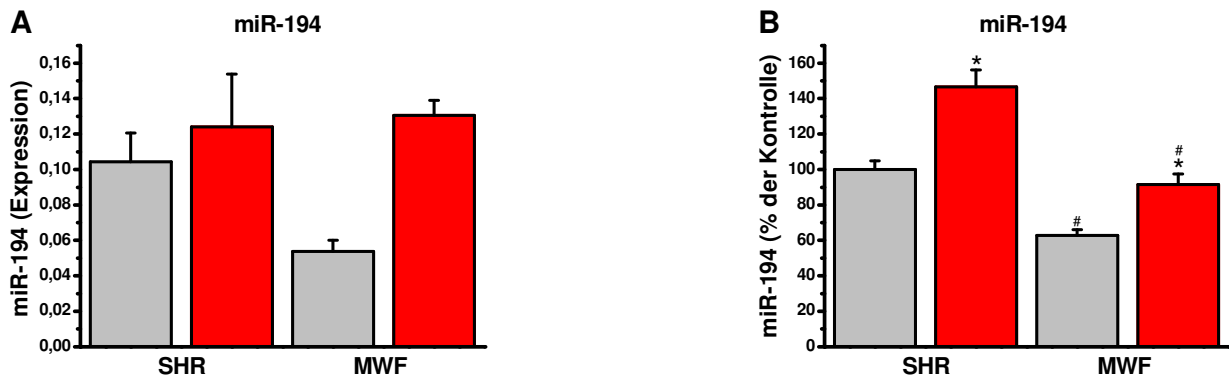


Das Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche erbrachte bei miR-192 einen Fold change von  $2,04 \pm 0,80$ . Die Konfirmierung ergab bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche einen signifikanten Unterschied. Die Expression stieg um etwa 44 % von  $49,5 \pm 3,5$  % auf  $71,2 \pm 5,1$  % ( $p < 0,05$ , Abb. 10). Bei SHR erhöhte sich die Expression von miR-192 signifikant von  $100,0 \pm 6,3$  % in der 8. Woche auf  $141,2 \pm 6,5$  % in der 24. Woche ( $p < 0,0001$ , Abb. 10). Zudem ergab sich bei MWF der 8. Woche eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zu SHR der 8. Woche ( $p < 0,0001$ , Abb. 10).



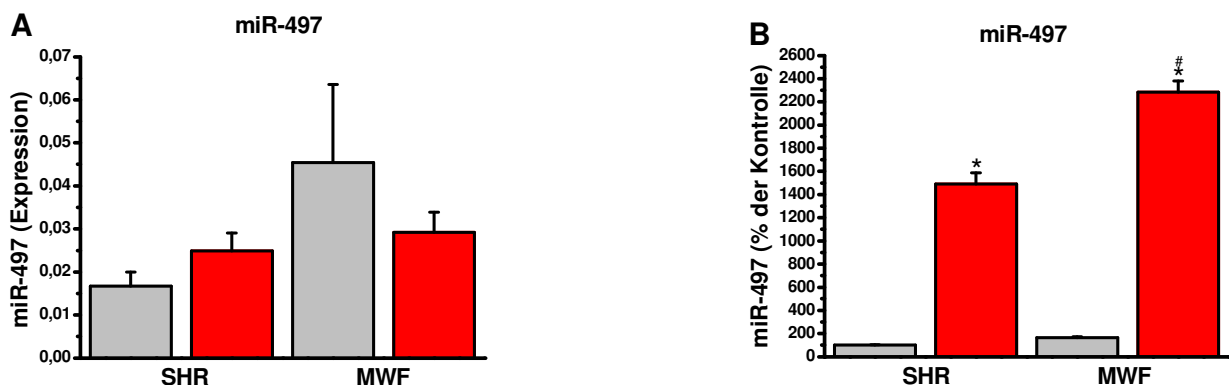
**Abb. 10: Identifizierung von miR-192 über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=2,04 und B, \* $p < 0,05$  vs. gleicher Stamm; # $p < 0,0001$  vs. SHR, gleiche Woche. FC, Fold Change.**

Bei miR-194 trat beim Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche ein Fold change von  $2,40 \pm 0,40$  auf. Die Konfirmierung ergab bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche einen signifikanten Anstieg um 45 % von  $62,9 \pm 3,1$  % auf  $91,5 \pm 6,0$  % ( $p < 0,01$ , Abb. 11). Die Expressionswerte erhöhten sich bei SHR signifikant von  $100,0 \pm 5,0$  % in der 8. Woche auf  $146,5 \pm 9,7$  % in der 24. Woche ( $p < 0,01$ , Abb. 11). Die Expression bei MWF der 8. Woche war signifikant niedriger im Vergleich zu SHR der 8. Woche und signifikant niedriger bei MWF der 24. Woche im Vergleich zu SHR der 24. Woche ( $p < 0,0005$ , Abb. 11)



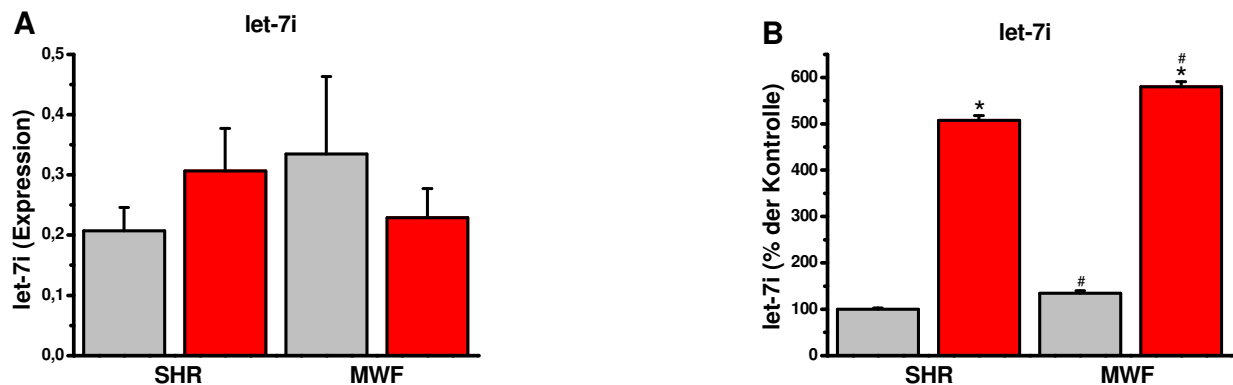
**Abb. 11: Identifizierung von miR-194 über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=2,40 und B, \*p=0,01 vs. gleicher Stamm; #p<0,0005 vs. SHR, gleiche Woche. FC, Fold Change.**

miR-497 verzeichnete im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche einen Fold change von  $0,65 \pm 0,28$ . Bei der Konfirmierung lag bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche ein signifikanter Anstieg um das 14-fache vor, von  $163,1 \pm 8,6$  % auf  $2284,6 \pm 94,5$  % ( $p < 0,0001$ , Abb. 12). Es fanden sich bei SHR signifikante Unterschiede in der Expression, welche sich von  $100,0 \pm 3,1$  % in der 8. Woche auf  $1489,1 \pm 99,6$  % in der 24. Woche erhöhte ( $p < 0,0001$ , Abb. 12). Außerdem war die Expression bei MWF der 24. Woche gegenüber SHR der gleichen Woche signifikant gesteigert ( $p < 0,0001$ , Abb. 12).



**Abb. 12: Identifizierung von miR-497 über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=0,65 und B, \*p<0,000 vs. gleicher Stamm; #p<0,0001 vs. SHR, 24. Woche. FC, Fold Change.**

Für let-7i zeigte sich im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche ein Fold change von  $0,67 \pm 0,29$ . Bei MWF nahm im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche die Expression von let-7i signifikant von  $134,7,1 \pm 5,5$  % auf  $580,0 \pm 11,2$  % zu ( $p < 0,0001$ , Abb. 13). Der SHR-Stamm wies einen signifikanten Expressionsanstieg um das 5-fache von  $100,0 \pm 2,7$  % in der 8. Woche auf  $507,4 \pm 10,3$  % in der 24. Woche auf ( $p < 0,0001$ , Abb. 13). Zudem trat eine signifikant höhere Expression bei MWF der 24. Woche im Vergleich zu SHR der gleichen Woche auf ( $p < 0,05$ , Abb. 13).

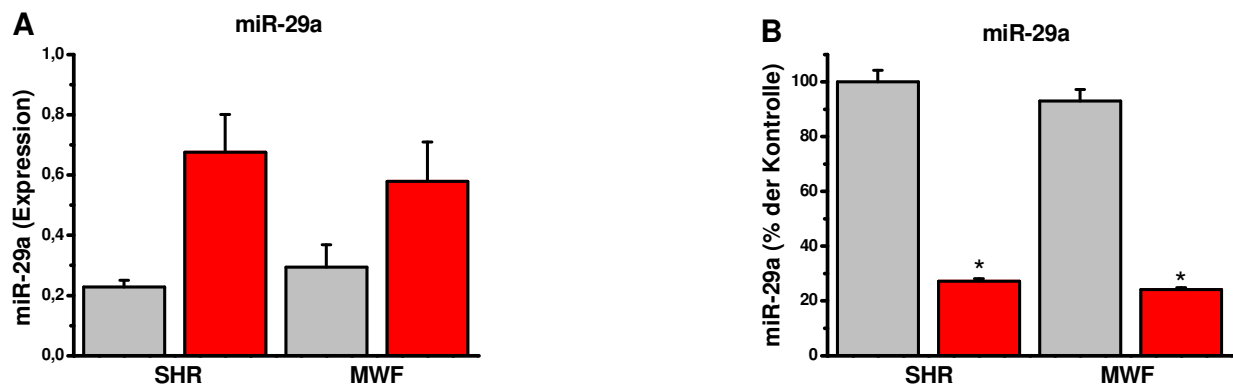


**Abb. 13: Identifizierung von let-7i über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=0,67 und B, \* $p < 0,0001$  vs. gleicher Stamm; # $p < 0,05$  vs. SHR, gleiche Woche. FC, Fold Change.**

#### 4.3.3 miR-29a, miR-29c, miR-150 und miR-347

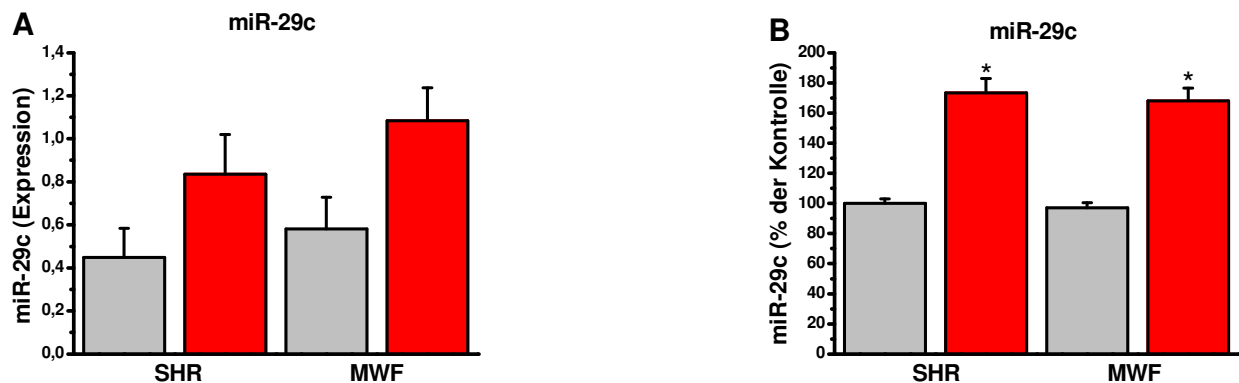
Vier weitere miRNAs, miR-29a, miR-29c, miR-150 und miR-347, zeigten eine beim MWF- und SHR-Stamm signifikante Expressionveränderung im Zeitverlauf, jedoch ohne Unterschied zwischen den Stämmen.

Im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche erzielte miR-29a einen Fold change von  $3,01 \pm 0,85$ . Bei der Konfirmierung ergab sich bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche ein signifikanter Abfall um fast das 3,5-fache von  $93,0 \pm 4,2$  % auf  $27,2 \pm 0,7$  % ( $p < 0,0001$ , Abb. 14). Bei SHR ließ sich ein signifikanter Abfall um das 4-fache von  $100,0 \pm 4,2$  % in der 8. Woche auf  $24,2 \pm 1,0$  % der Kontrolle feststellen ( $p < 0,0001$ , Abb. 14).



**Abb. 14: Identifizierung von miR-29a über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=3,01 und B, \*p<0,0001 vs. gleicher Stamm. FC, Fold Change.**

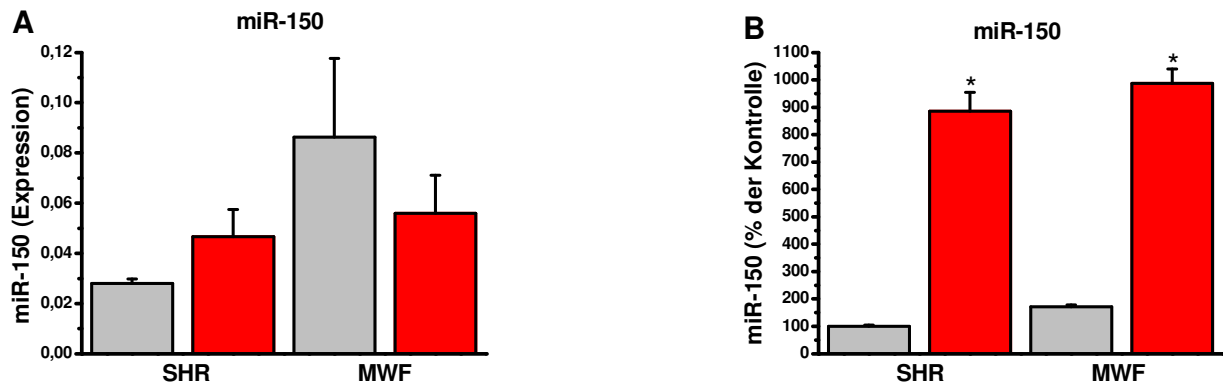
MiR-29c erreichte im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche einen Fold change von  $2,15 \pm 1,29$ . Bei der Konfirmierung konnte bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche ein signifikanter Anstieg von  $96,6 \pm 3,5$  % auf  $168,1 \pm 8,3$  % ermittelt werden ( $p < 0,0001$ , Abb. 15). In SHR-Tieren war ein signifikanter Anstieg der Expression von  $100,0 \pm 2,9$  % in der 8. Woche auf  $173,5 \pm 9,5$  % in der 24. Woche zu verzeichnen ( $p < 0,0001$ , Abb. 15).



**Abb. 15 : Identifizierung von miR-29c über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=2,15 und B, \*p<0,0001 vs. gleicher Stamm. FC, Fold Change.**

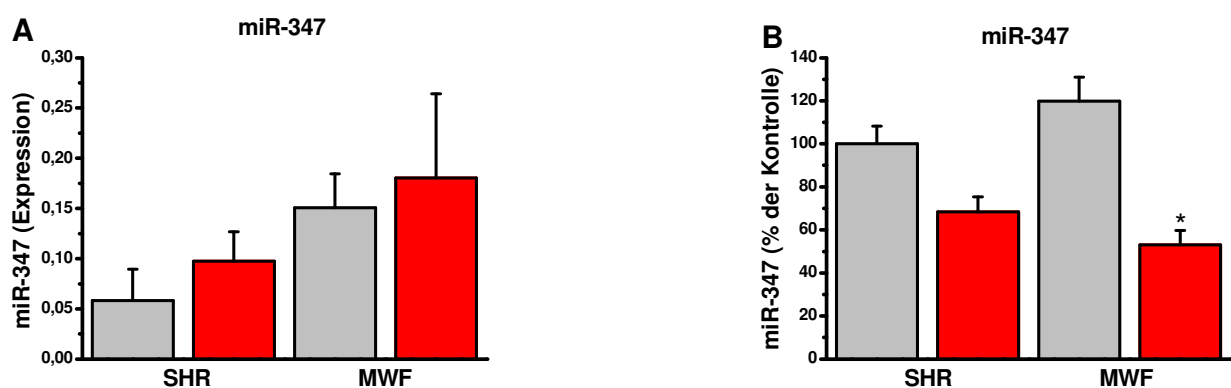
Im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche zeigte sich bei miR-150 ein Fold change von  $0,66 \pm 0,26$ . Die Konfirmierung mittels Realtime-PCR ergab bei MWF im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche einen signifikanten Anstieg um das über 5-fache von  $171,3 \pm 7,2$  % auf  $987,0 \pm 52,4$  % ( $p < 0,0001$ , Abb. 16). Bei SHR erhöhte sich

die Expression von miR-150 ebenfalls signifikant von  $100,0 \pm 4,8$  % in der 8. Woche auf  $886,1 \pm 68,7$  % in der 24. Woche ( $p < 0,0001$ , Abb. 16).



**Abb. 16:** Identifizierung von miR-150 über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=0,66 und B, \* $p < 0,0001$  vs. gleicher Stamm. FC, Fold Change.

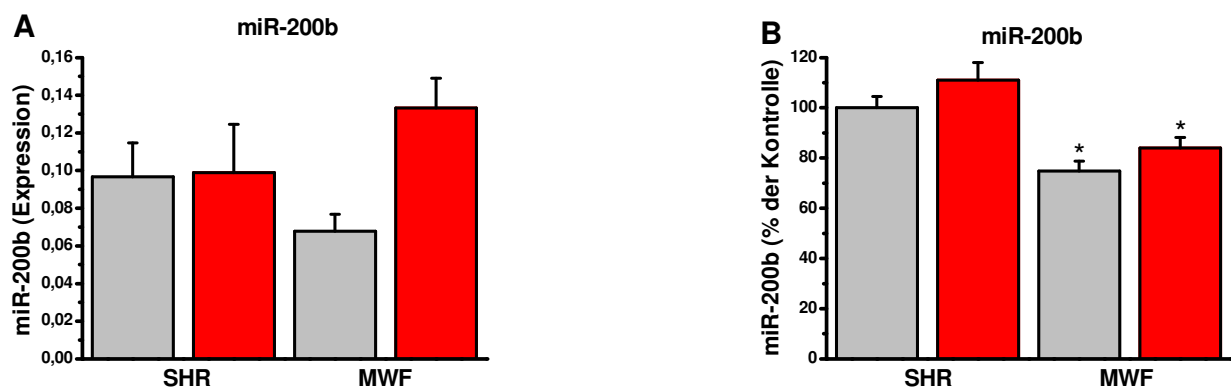
Das Microarray-Profilung von SHR-Ratten der 8. und 24. Woche wies bei miR-347 einen Fold change von  $2,11 \pm 1,12$  auf. Bei SHR konnte bei der Konfirmierung im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche ein signifikanter Abfall von  $100,0 \pm 8,2$  % auf  $68,4 \pm 7,0$  % beobachtet werden ( $p < 0,0001$ , Abb. 17). Bei MWF erreichte die Expression von miR-347 von der 8. zur 24. Woche keinen signifikanten Unterschied. (Abb. 17).



**Abb. 17:** Identifizierung von miR-347 über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=2,11 und B, \* $p < 0,001$  vs. gleicher Stamm. FC, Fold Change.

### 4.3.4 miR-200b

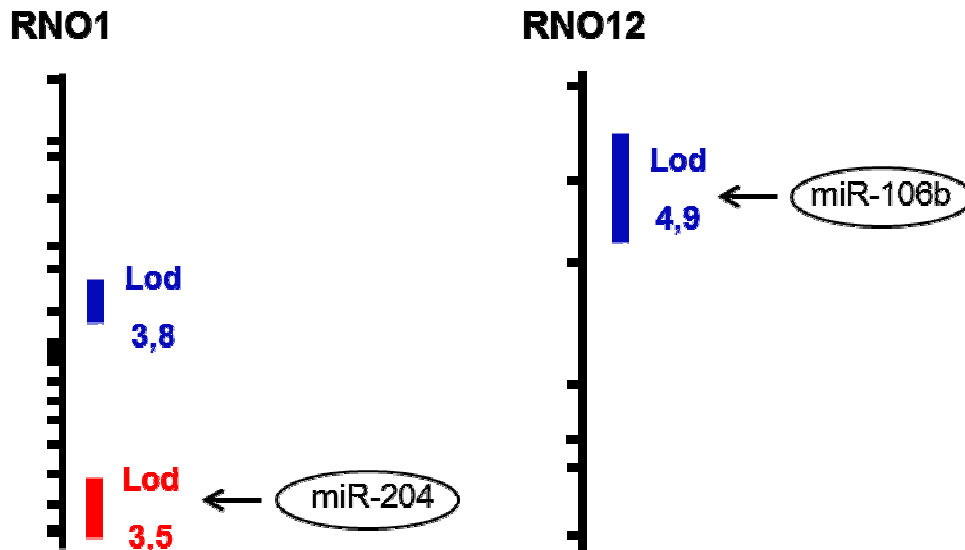
miR-200b konnte als einzige miRNA nicht konfirmiert werden. Bei miR-200b lag im Microarray-Profilung von MWF-Ratten der 8. und 24. Woche ein Fold change von  $1,97 \pm 0,54$  vor. Weder bei der Konfirmierung von MWF noch bei SHR verhielt sich der Unterschied in der Expression im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche signifikant (Abb. 18). Allerdings ist bei MWF jeweils in der 8. und 24. Woche die Expression signifikant niedriger als in SHR-Ratten ( $p < 0,05$ , Abb. 18).



**Abb. 18:** Identifizierung von miR-200b über eine (A) Microarray-Analyse und (B) Konfirmierung mittels quantitativer Realtime-PCR bei SHR- und MWF-Ratten im Zeitvergleich der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). A, FC=1,97 und B, \* $p < 0,05$  vs. SHR, gleiche Woche. FC, Fold Change.

### 4.4 Kartierung der miRNAs in Albuminurie-QTL beim MWF-Rattenstamm

Bei der MWF-Ratte wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit Hilfe von Kosegrations- und Kopplungsanalysen 11 Albuminurie-QTL bei der MWF-Ratte identifiziert. Interessanterweise kartiert miR-204 in den Albuminurie-QTL auf RNO1 und miR-106b in den Albuminurie-QTL auf RNO12 (Abb. 19). Die restlichen konfirmierten miRNAs sind außerhalb von Albuminurie-QTL der MWF-Ratte lokalisiert.



**Abb. 19: Konfirmierte miRNAs in Albuminurie-QTL der MWF-Ratte.**

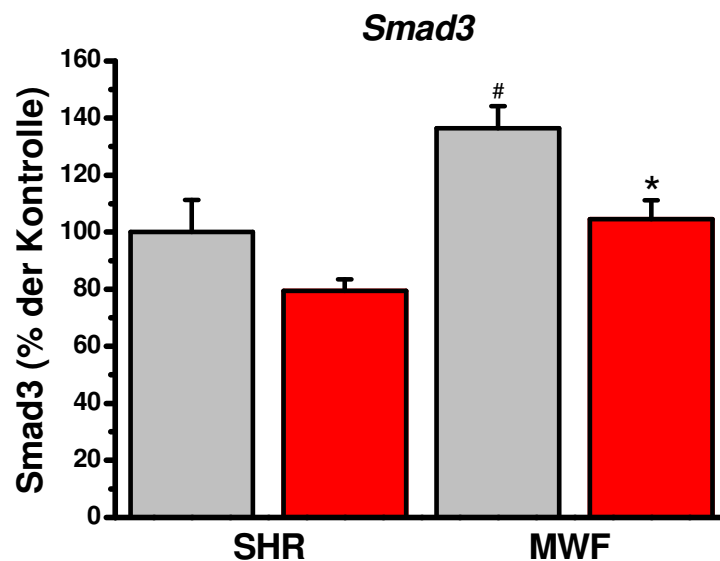
Dargestellt sind miR-204 und miR-106b, welche in einen Albuminurie-QTL auf RNO1 bzw. auf RNO12 kartieren. Die QTL stammen aus Kartierungsuntersuchungen zwischen MWF und jeweils den Referenzstämmen SHR (roter Balken) oder Lewis (blauer Balken). Der Lod-Score ist ein Maß für die Kopplungswahrscheinlichkeit.

#### 4.5 Ziel-mRNAs der differentiell exprimierten miRNAs

MiRNAs sind kleine, nicht-kodierende Abschnitte im Genom, die in der Lage sind eine große Anzahl von mRNAs posttranskriptionell zu regulieren und deren Translation zu unterdrücken. Eine Datenbankrecherche über das Analyseprogramm TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) diente der Überprüfung, ob die Genprodukte von *Tgfb1* und *Smad3* potentielle Ziele für die konfirmierten miRNAs sind. TGF- $\beta$ 1 und Smad3 scheinen bei der Entwicklung einer renalen Fibrose involviert zu sein und mit zahlreichen miRNAs zu interagieren. (Lan, 2011). Nach aktuellem Stand wird beim Menschen transforming growth factor, beta receptor II (*TGFBR2*) von miR-301a und bei der Ratte transforming growth factor, beta receptor II (*Tgfb2*) von miR-106b reguliert. Bei der Ratte ist transforming growth factor, beta-induced (*Tgfb1*) ein Ziel von miR-21. MiR-192 reguliert bei Menschen die Expression von TGFB-induced factor homeobox 2-like, Y-linked (*TGIF2LY*). Die restlichen miRNAs sind zurzeit nicht als Regulatoren von *Tgfb1* und *Smad3* bekannt.

## 4.6 Die Kandidatengene *Smad3* und *Tgfb1*

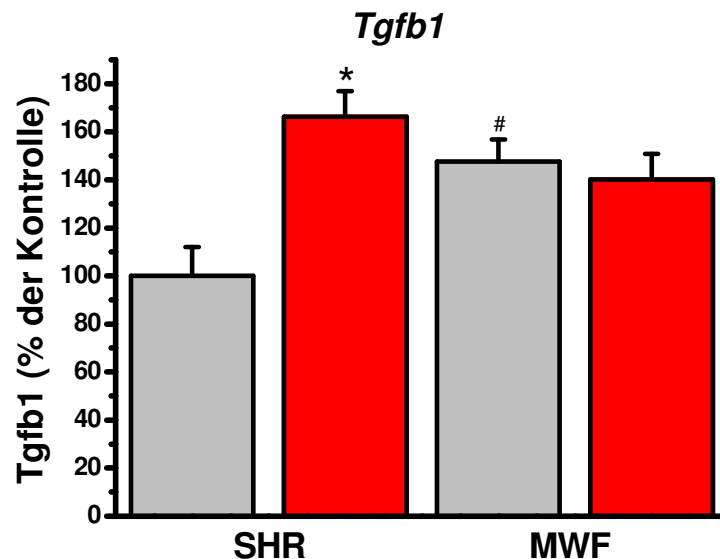
Die Bestimmung der differentiellen mRNA-Genexpression von *Smad3* mittels Realtime-PCR wies bei SHR im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 20). Bei MWF erreichte die Expression von *Smad3* von der 8. zur 24. Woche einen signifikanten Abfall von  $136,5 \pm 7,8$  % auf  $104,5 \pm 6,6$  % ( $p < 0,05$ , Abb. 20). Die Expression ist bei MWF der 8. Woche signifikant höher im Vergleich zu SHR der 8. Woche ( $p < 0,02$ , Abb. 20).



**Abb. 20: Differentielle Genexpressionsanalyse mittels Realtime-PCR von *Smad3* beim SHR- und MWF-Stamm der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). \* $p < 0,05$  vs. gleicher Stamm; # $p < 0,02$  vs. SHR, gleiche Woche.**

Die differentielle Genexpressionsanalyse von *Tgfb1* ergab für den SHR-Stamm im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche einen signifikanten Anstieg von  $100,0 \pm 12,0$  % auf  $166,2 \pm 10,8$  % ( $p < 0,003$ , Abb. 21). Bei MWF lag bei der Expression von *Tgfb1* in der 8. in der 24. Woche kein signifikanter Unterschied vor (Abb. 21). Zum Zeitpunkt der 8. Woche ist bei MWF die Expression signifikant höher um 48 % im Vergleich zu SHR ( $p = 0,02$ , Abb. 21).





**Abb. 21: Differentielle Genexpressionsanalyse von *Tgfb1* beim SHR- und MWF-Stamm der 8. Woche (grauer Balken) und 24. Woche (roter Balken). \* $p < 0,003$  vs. gleicher Stamm; # $p < 0,02$  vs SHR, gleiche Woche.**

#### 4.7 Sequenzierungsanalyse der bestätigten miRNAs

Bei keiner der bestätigten miRNAs konnten Sequenzvarianten in Form von SNPs oder INDELs in der Stem-loop Sequenz oder in der reifen Sequenz nachgewiesen werden. Berücksichtigt wurden dabei jeweils  $\pm 10$  kb der Basenpaarlokalisierungen. Somit liegt die Ursache der ermittelten Expressionsunterschiede bei den miRNAs nicht an SNPs oder INDELs (small insertions and deletions) innerhalb der miRNAs, die in der Tabelle 3 aufgeführt sind. Die Basenpaarlokalisierungen sind dem Rat Genome Sequencing Consortium v3.4 (RGSC v3.4) entnommen. Für rno-miR-347 ist aufgrund der nicht bekannten Lokalisation keine Aussage möglich. In keiner der aufgeführten Regionen konnten SNPs bei den Rattenstämmen MWF- oder SHR im Vergleich zum Referenzgenom Brown Norway (Rn34 BN, Prof. Norbert Hübner, MDC Berlin) identifiziert werden. Es gibt somit keine Sequenzunterschiede zwischen MWF und SHR. Des Weiteren wurden in einem 7 Mio SNPs umfassenden Pool (Affymetrix-Array, Prof. Norbert Hübner, MDC Berlin) keine SNPs der miRNAs detektiert.

**Tab. 3. Mutationsanalyse auf SNPs und INDELS der bestätigten miRNAs (RNO, *Rattus norvegicus*).**

MiRNA	Gene acc.	Reife Sequenz	RNO	Basenpaar-Lokalisation	Mutationen
miR-15b	MI0000843	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	2	158,992,234- 158,992,331	-
miR-21	MI0000850	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	10	74,864,500- 74,864,591	-
miR-29a	MI0000863	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	4	58,107,760- 58,107,847	-
miR-29b-1	MI0000864	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	4	58,108,139- 58,108,219	-
miR-29b-2	MI0000862	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	13	110,967,520- 110,967,600	-
miR-29c	MI0000865	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	13	110,968,048- 110,968,135	-
miR-106b	MI0000889	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	12	17,608,382- 17,608,463	-
miR-150	MI0000920	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	1	95,596,077- 95,596,161	-
miR-192	MI0000935	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	1	209,040,256- 209,040,365	-
miR-194-1	MI0000937	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	13	101,312,447- 101,312,529	-
miR-194-2	MI0000938	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	1	209,040,071- 209,040,155	-
miR-200a	MI0000943	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	5	172,898,220- 172,898,308	-
miR-200b	MI001800	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA	5	172,898,998- 172,899,092	-
miR-204	MI0000946	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	1	226,012,994- 226,013,103	-
miR-301a	MI0000593	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAAGC	10	75,386,838- 75,386,937	-
miR-347	MI0000635	UGUCCCUCUGGGUCGCCCA		not available	Keine Kartierung
miR-497	MI0003724	CAGCAGCACACUGUGGUUUGUA	10	57,073,846- 57,073,914	-
let-7i	MI0000835	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	7	62,755,360- 62,755,444	-

## 5 Diskussion

Eine erhöhte Albuminurieausscheidung gilt als wichtiger unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor, der selbst bei ansonsten gesunden Menschen die kardiovaskuläre Mortalität erhöht (de Zeeuw et al., 2006). Zudem wird die Albuminurie mit renalen Erkrankungen wie dem chronischen Nierenversagen und hypertensiven Krankheiten assoziiert und trägt somit zur Erhöhung der Gesamtmortalität bei (Barzilay et al., 2004, Gansevoort et al., 2011). Aufgrund der Schlüsselrolle der Albuminurie bezüglich kardiovaskulärer und renaler Geschehen ist es von grosser Bedeutung die pathomechanischen Grundlagen der Albuminurieentwicklung zu verstehen. Beim Menschen stellen die Heterogenität und die unterschiedlichen Umweltbedingungen ein Erschwernis bei der Ursachenforschung dar. Aus diesem Grund haben sich ingezüchtete Tiermodelle etabliert bei denen ein quantitatives Merkmal, wie zum Beispiel Albuminurie, besonders ausgeprägt ist. Für renale Erkrankungen wie der Albuminurie stellt die MWF-Ratte ein geeignetes Tiermodell dar (Kreutz et al., 2000; Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Wie beim Menschen führt auch bei diesem Tiermodell eine Kombination aus Albuminurie, spontanen arteriellen Hypertonus und weiteren renalen Schädigungen zur Niereninsuffizienz. Besonders auffällig ist die frühe Entwicklung der Albuminurie bei der MWF-Ratte mit einem progressiven Anstieg im Alter. Aus diesem Grund wurde eine genomweite Analyse in Form eines Microarrays zur Detektion von miRNAs in der Niere mit einem altersabhängigen Effekt auf die Albuminurie vorgenommen.

Die differentielle Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Realtime-PCR ist eine der genauesten und zuverlässigsten Methoden, um Ergebnisse eines Microarrays zu bestätigen (Gachon et al., 2004). Die Vorteile sind die Sensitivität, die hohe Geschwindigkeit der Analyse, sowie die exakte Messung des untersuchten Gewebes (Gachon et al., 2004). Um jedoch die Validität der Ergebnisse zu maximieren, bedarf es einer Referenz-miRNA, die als endogene Kontrolle bei miRNA-Analysen dient.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine geeignete Referenz-miRNA für die quantitativen Realtime-PCR-Assays von miRNAs bei der MWF-Ratte bestimmt werden. Die ausgewählte Referenz-miRNA miR-16 aus dem untersuchten Microarray zeichnet sich durch eine stabile Expression im Glomerulum sowohl der SHR- und MWF-Ratte in der 8. und 24. Woche aus. Als Referenz-miRNA muss sie im untersuchten Gewebe

stabil exprimiert werden, ansonsten kann es zu artifiziellen Schwankungen in den Ergebnissen der PCR-Assays kommen (Bustin, 2000). Somit ist die sorgfältige Bestimmung einer geeigneten Referenz-miRNA eine essentielle Voraussetzung für jedes einzelne Experiment mit Realtime-PCR-Assays (Kozera & Rapacz, 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmalig im Glomerulum der MWF-Ratte 11 miRNAs miR-21, miR-200a, miR-200b, miR-192, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-204, miR-106b, miR-15b und miR-150 identifiziert werden, die in die Regulation der altersabhängigen Albuminurie-Progression direkt oder indirekt involviert sein könnten. Diese miRNAs wiesen einen Unterschied in der Expression im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche auf mit signifikantem Unterschied zwischen dem untersuchten MWF-Stamm und dem Referenzstamm SHR. MiR-21 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von diversen Erkrankungen der Niere, zum Beispiel der renalen Fibrose (Zhong et al., 2011). Die Arbeitsgruppe um Zhong konnte bei ihren Untersuchungen bei zwei etablierten Tiermodellen der renalen Fibrose, die unilaterale urethrale Obstruktion bei der Maus (UUO) und das Mausmodell mit der ischämischen Reperfusionverletzung (IRI) einen Anstieg der Expression von miR-21 in der Niere nachweisen (Zhong et al., 2011). Bei der MWF-Ratte konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Expression im Zeitverlauf von der 8. zur 24. Woche gezeigt werden. Der zeitliche Anstieg der miR-21-Expression bei der MWF-Ratte mit der verschlechterten Nierenfunktion, der erhöhten Albuminurie und leichten Fibrose steht im Einklang mit dem Erkenntnis, dass die renale Fibrose ein fortgeschrittenes Stadium der chronischen Niereninsuffizienz darstellt (Patel and Nouredine, 2012). Darüber hinaus wird die Expression von miR-21 in fibrosierten Nieren unter anderem über den TGF- $\beta$ /Smad-Pathway reguliert (Zhong et al., 2011). Zhong et al. wiesen in ihren Studien nach, dass TGF- $\beta$ 1 die Expression von miR-21 in tubulären Epithelzellen induziert, vermittelt über Smad3. Zudem führte eine Inhibition von miR-21 zu einer Abmilderung der renalen Fibrose (Zhong et al., 2011). Damit könnte ein medikamentöses Targeting zur Unterdrückung der Expression von miR-21 sich als neuer Ansatz zur Entwicklung von Medikamenten gegen die renale Fibrose bei zahlreichen renalen Erkrankungen etablieren (Zhong et al., 2011). Von grosser Bedeutung ist nicht nur die medikamentöse Therapie von chronischen Nierenerkrankungen sondern auch das Detektieren der Erkrankung in einem frühen Stadium. Bisher wurden zur Diagnostik vor allem die Proteinurie sowie die Histologie von Nierenbiopsien als prognostische Faktoren für die Entwicklung der chronischen

Nierenerkrankungen genutzt (Remuzzi & Bertani, 1998; Becker & Hewitson, 2000). Einen Ausblick in zukünftige Möglichkeiten der Detektion bieten Szeto et al., die feststellten, dass die Expression von miR-21 im Urin mit der Progression der renalen Verschlechterung und dem Risiko des dialyseabhängigen Nierenversagens korreliert (Szeto et al., 2012). Somit könnten in Zukunft nicht-invasive Biomarker für die chronische Niereninsuffizienz entwickelt werden, die möglichst früh Pathologien erkennen und eine schnelle therapeutische Intervention ermöglichen.

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass eine erniedrigte Expression der miR-200-Familie die renale Fibrose fördert (Wang et al., 2011; Xiong et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit mit der nierenkranken MWF-Ratte ergab die differentielle Expressionsanalyse eine stabile Expression von miR-200a und 200b im Zeitverlauf im Glomerulum, welche signifikant niedriger als beim nierengesunden Referenzstamm SHR war. Auch bei anderen Tiermodellen wie dem nierenkranken diabetischen Mausmodell war die Expression der miR-200-Familie signifikant erniedrigt (Wang et al., 2011). Darüber hinaus wurde bei Untersuchungen mit NRK-Zellen nachgewiesen, dass die Expression von miR-200a und miR-200b durch eine Induktion von TGF- $\beta$ 1 supprimiert wird (Wang et al., 2011). In Microarray-Untersuchungen bei Ratten mit unilateraler urethraler Obstruktion wurde festgestellt, dass diese Expressionsunterdrückung über einen Smad3-abhängigen Pathway reguliert wird (Xiong et al., 2012). Wang et al. überprüften die Bedeutung von miR-200a für renale Erkrankungen, indem sie eine Überexpression von miR-200a erzielten und somit eine Unterdrückung von Collagen I und IV verursachten, welche mit der Entwicklung der renalen Fibrose assoziiert sind (Wang et al., 2011). Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass miR-200a vermutlich ein Inhibitor der TGF- $\beta$ -vermittelten Fibrose ist und zudem die Aktivität von SMAD3 vermindert (Wang et al., 2011). Diese Erkenntnisse könnten genutzt werden, um antifibrotische Targettherapien mittels miR-200a zu entwickeln (Meng et al., 2013). Dazu im Widerspruch stehen die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Wang et al., die Patienten mit hypertensiver Nephrosklerose untersuchten, die durch Nierenbiopsien bereits bestätigt war (Wang et al., 2010a). Die intrarenale Expression von miR-200a und miR-200b war bei diesen Patienten signifikant erhöht und korrelierte mit klinischen Parametern wie Albuminurie und GFR (Wang et al., 2010a). Die hypertensive Nephrosklerose gilt dabei als ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der chronischen Niereninsuffizienz, wobei der Mechanismus einer

möglichen Regulation der Nephrosklerose durch die miRNAs in Zukunft noch erforscht werden müssen. Ein möglicher Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der miR-200 Familie kann die Eigenschaft von miRNAs sein, über viele unterschiedliche Ziel-miRNAs zu verfügen und somit in unterschiedlichem Gewebe und Zellmaterial die Expression unterschiedlicher Gene zu beeinflussen. Zudem ist in der 2010 von Wang et al. veröffentlichten Studie nicht untersucht worden, in welchem konkreten Zelltyp die Expression der miRNAs in den Nierenbiopsien bestimmt wurde (Wang et al., 2010a).

TGF- $\beta$ 1 gehört zur TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )-Superfamilie, die aus einer Vielzahl an verschiedenen Genen, wie zum Beispiel BMP (bone morphogenic proteins) besteht (Massagué & Wotton, 2000). TGF- $\beta$ 1 spielt unter anderem eine wichtige Rolle im Pathomechanismus und in der Regulation von diversen chronischen renalen Erkrankungen, wie der renalen Fibrose (Böttinger & Bitzer, 2002). Unabhängig von den primären Ursachen einer Nierenschädigung zeigt sich in der fibrotischen Niere eine signifikante Überexpression von TGF- $\beta$  (Wang et al., 2005). Auch beim MWF-Stamm ist die Expression von *Tgfb1* bereits in den jungen MWF-Ratten der 8. Woche signifikant höher ausgeprägt als beim Kontrollstamm SHR. Bei dem nierengesunden Kontrollstamm SHR ist im Zeitverlauf ein signifikanter Anstieg der Expression von *Tgfb1* festzustellen. Der profibrotische Effekt von TGF- $\beta$  auf die Niere konnte auch in anderen in vitro und in vivo Experimenten demonstriert werden, bei denen eine Blockade von TGF- $\beta$  durch TGF- $\beta$ -Antikörper zu einer Verbesserung der renalen Fibrose führte (Border & Noble, 1998). TGF- $\beta$  steuert die Fibrogenese durch eine Reihe von Mechanismen. Es induziert die Matrixbildung durch Smad3-abhängige und unabhängige Mechanismen, verhindert die Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) durch Unterdrückung der MMPs (Matrixmetalloproteasen), induziert die Inhibitoren der MMPs und induziert wahrscheinlich die Myoblastenbildung durch epithelial-mesenchymale Transition (Border & Noble, 1998; Lan, 2011).

Die TGF- $\beta$  -Signaltransduktion wird durch heterodimerische Rezeptoren der Smad-Familie vermittelt (Massague and Wotton, 2000). Dabei bindet TGF- $\beta$  seinen Rezeptor T $\beta$ RII (Typ II TGF- $\beta$ -Rezeptor), um seinen Rezeptor T $\beta$ RI (Typ I TGF- $\beta$ - Rezeptor) zu aktivieren. Nach der Aktivierung verläuft die weitere Signaltransduktion in den Zellkern durch die Phosphorylierung von Rezeptor-regulierten Smads wie Smad2 und Smad3, um die Transduktion ihrer Targetgene zu induzieren (Meng et al., 2013). Neben dem Smad-abhängigen Pathway bestehen noch einige andere Signalwege für TGF- $\beta$ , unter

anderem über p53, Ets-1 (v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1), MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase) und ERK (extrazelluläre signalregulierte Kinase) (Derynck & Zhang, 2003; Deshpande et al., 2013; Kato et al., 2013).

Smad3 wird bei der renalen Fibrose stark aktiviert (Chung et al., 2013). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch bei der nierenkranken MWF-Ratte wider, bei der die Expression von *Smad3* in der 8. Woche signifikant höher als beim Kontrollstamm SHR ist. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Deletion von Smad3, zum Beispiel in Form eines Knockoutmodells zu einer Verminderung der renalen Fibrose bei zahlreichen Nierenerkrankungen führen kann, zum Beispiel bei hypertensiver und diabetischer Nephropathie (Chen et al., 1999; Fujimoto et al., 2003, Chung et al., 2010). Weshalb im weiteren Zeitverlauf die Expression von *Smad3* bei MWF signifikant sinkt, ist bisher ungeklärt und bleibt Gegenstand zukünftiger Studien.

MiR-192 gilt als wichtiger Vermittler in der TGF- $\beta$  -induzierten renalen Fibrose (Chung et al., 2010). In der Konfirmierung der differentiellen Expression verzeichnete miR-192 einen signifikanten Anstieg im Zeitverlauf bei der MWF-Ratte, dabei war die Expression bei MWF in der 8. Woche signifikant niedriger als bei SHR der gleichen Woche. Chung et al. stellten in ihren Analysen fest, dass eine Überexpression von miR-192 mimics zu einer Verstärkung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Expression von tubulärem Kollagen I und die Überexpression von anti-miR-192 zu einer Blockade der tubulären Kollagen I-Expression führte (Chung et al., 2010). Mimics sind chemisch entwickelte, doppelsträngige RNAs, die nach Transfektion in Zellen die Funktion von reifer endogener miRNA nachahmen können. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die tubuläre TGF- $\beta$ -induzierte Expression von miR-192 über Smad3 gesteuert wird, wobei Smad wahrscheinlich mit der Promoterregion von miR-192 interagiert (Chung et al., 2010). Allerdings gibt es auch Studien, die zu einem anderen Ergebnis kommen und die These aufstellen, dass die Expression von miR-192 durch TGF- $\beta$ 1 reduziert wird und zum Beispiel bei diabetischer Nephropathie erniedrigt ist (Krupa et al., 2010). Die widersprüchlichen Resultate kommen wahrscheinlich durch die Anwendung verschiedener Dosierungen und Zelltypen bei den Experimenten zustande. Eine Möglichkeit die Ergebnisse zu überprüfen wäre die Forschung zum Beispiel an NRK-Zellen, eine Zelllinie aus der Niere der Ratte von der Spezies *Rattus norvegicus*, bei denen eine Transfektion von anti-TGF- $\beta$ 1 erfolgen könnte. Damit ließe sich eine Regulation der Expression von miR-192 nachweisen.

Die Analysen bei der MWF-Ratte zur miR-29-Familie zeigten unterschiedliche Expressionsmuster im Zeitverlauf. MiR-29a fällt beispielsweise bei MWF von der 8. zur 24. Woche signifikant ab, kohärent zu den Studien anderer Arbeitsgruppen, bei denen eine niedrige miR-29 Expression mit der Progredienz von renaler Fibrose assoziiert wurde (Wang et al., 2012a). Darüber hinaus wird die Hypothese aufgestellt, dass im Rahmen der renalen Fibrose Smad3 die Expression der miR-29-Familie reguliert. Die miR-29-Familie wird beim induzierten Mausmodell der renalen Fibrose (UUO) jeweils im Smad3-Wildtyp herunterreguliert und in der Smad3-Knockoutmaus stärker exprimiert (Qin et al., 2011). Eine Deletion von Smad3 verhindert somit ein Herunterregulieren der miR-29-Familie in der fibrotischen Niere (Qin et al., 2011). Außerdem wird vermutet, dass die Expression von miR-29 von TGF- $\beta$ 1 über einen Smad3-abhängigen Mechanismus gesteuert wird (Qin et al., 2011). MiR-29 stellt sich dabei als Inhibitor der TGF- $\beta$ /Smad3-regulierten renalen Fibrose dar, in dem es die Expression von Collagen I und II hemmt (Qin et al., 2011). In Zukunft könnten Strategien entwickelt werden, über eine medikamentös induzierte Expression von miR-29 in der Niere die Progression der renalen Fibrose zu verhindern (Qin et al., 2011).

Interessanterweise steigt bei der MWF-Ratte jedoch die Expression von miR-29b und miR-29c im Gegensatz zu miR-29a im Zeitverlauf signifikant an. Ähnliche Befunde wurden bei Untersuchungen der Expression von miR-29c beim diabetischen Mausmodell beobachtet, die ebenfalls signifikant erhöht war (Long et al., 2011). Zudem führte die Unterdrückung von miR-29c mittels Antisense-Technik bei einem diabetischen Mausmodell zu einem signifikanten Abfall der Albuminurie und mesangialen Matrix Akkumulation in der Niere (Long et al., 2011). Die unterschiedlichen Ergebnisse bei den diversen Studien lassen sich wahrscheinlich auf die Anwendung verschiedener Tiermodelle, verschiedener Zelllinien und Untersuchungstechniken, sowie bisher unbekannter protektive oder pathologische Faktoren in den Tiermodellen zurückführen. Um die Ergebnisse bei der MWF-Ratte weiter zu evaluieren, könnte man in nachfolgenden Arbeiten eine Überexpression von miR-29 in der MWF-Ratte erzeugen und überprüfen, welche Auswirkung dieses auf die renale Fibrose hätte.

MiR-204 kartiert in den Albuminurie-QTL auf RNO1 der MWF-Ratte und nimmt vermutlich eine beeinflussende Rolle bei der Entwicklung der Albuminurie ein, da miR-204 unter anderem den TGF- $\beta$ 2 als Target von miR-204 aufweist (Butz et al., 2012). Für miR-204 wurde eine signifikante Erhöhung ihrer Expression im Zeitverlauf bei der



MWF-Ratte ermittelt. Einen Einfluss auf den TGF- $\beta$ -Pathway könnte somit zum Beispiel im Zusammenhang mit der Entwicklung der renalen Fibrose stehen. Dies wird gestützt durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die feststellten, dass TGF- $\beta$ , induziert in NRK-Zellen, die Expression von miR-204 in proximalen Tubuli signifikant erhöhte. (Wang et al., 2010b). Um den pathophysiologischen Mechanismus besser verstehen zu können, müssen weitere Studien in Zukunft folgen.

MiR-106b verzeichnete in der Konfirmierung einen zeitabhängigen Abfall der Expression bei der MWF- und SHR-Ratte, wobei die Expression bei MWF in der 8. Woche signifikant höher war als bei SHR der 8. Woche. Darüber hinaus kartiert miR-106b in den Albuminurie-QTL auf RNO12 der MWF-Ratte (Schulz & Kreutz, 2012). Studien anderer Arbeitsgruppen unterstreichen die Annahme, dass miR-106b möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathogenese der renalen Fibrose spielt. Die tubulointerstitielle Fibrose, die auch bei der MWF-Ratte ein charakteristisches phänotypisches Merkmal ist, trägt zur Entwicklung der chronischen Niereninsuffizienz und somit zum Nierenversagen bei (Zeisberg & Neilson, 2010). Ein wichtiger Faktor für die Entstehung von renaler Fibrose ist die epithelial-mesenchymale Transition, welche durch die Expression von miR-106b durch inhibitorische Einflüsse auf die Expression des TGF- $\beta$  Typ II Rezeptors und den TGF- $\beta$  Signal Pathway reduziert wird (Tang et al., 2014). Diese Aussage korreliert mit dem starken Abfall der Expression von miR-106b im Zeitverlauf bei MWF, der zur verstärkten epithelial-mesenchymalen Transition führen und somit die Progression der renalen Fibrose fördern könnte. In nachfolgenden Stunden könnte mit Hilfe von miR-106b mimics, die in vivo in MWF-Ratten transfiziert werden, direkt eine mögliche Verminderung der renalen Fibrose überprüft werden.

In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit chronischem Nierenversagen im Vergleich zu ihren gesunden Kontrollen der Pegel an zirkulierenden miR-15b im Blutplasma stark abgesunken war (Wang et al., 2012b). Dazu korrelierten die Plasmawerte von miR-15b mit dem Phosphatspiegel, wobei Hyperphosphatämie die vaskuläre Kalzifizierung bei chronischer Niereninsuffizienz vorantreibt und somit die kardiovaskuläre Mortalität erhöht (Ossareh, 2011). MiR-15b hat eine im Zeitverlauf signifikant abfallende Expression bei MWF und SHR. Die zirkulierende miR-15b könnte somit eine Rolle in der Entwicklung der chronischen Niereninsuffizienz spielen. In weiterführenden Studien liesse sich die Expression von miR-15 zusätzlich im

Blutplasma der MWF- und SHR-Ratten bestimmen, um die von Wang et al. getroffenen Aussagen direkt für die Rattenmodelle zu überprüfen.

Luo et al. konnten in ihren Forschungen bei Kindern mit nephrotischen Syndrom erhöhte Konzentrationen von miR-150 im Serum detektieren (Luo et al., 2013). Bisher ist unklar, wie es genau zu der erhöhten Konzentration im Blut kommt. Es wird vermutet, dass eine Immundysregulation an der Pathophysiologie des nephrotischen Syndroms beteiligt sein könnte (Bagga & Mantan, 2005). Da miR-150 in hohen Konzentrationen in lymphoiden Zellen nachgewiesen wurde, könnte es ebenfalls die Entwicklung des nephrotischen Syndroms beeinflussen (Brenu et al., 2012). Die Expression von miR-150 war sowohl bei MWF als auch bei SHR signifikant stärker ausgeprägt in der 24. Woche im Vergleich zur 8. Woche. In Zukunft könnte sich miR-150 nach weiteren Untersuchungen als neuer diagnostischer und prognostischer Biomarker für das nephrotische Syndrom etablieren, da miR-150 an der Pathogenese der renalen Fibrose bei Lupusnephritis beteiligt ist (Zhou et al., 2013). Diese Hypothese wird gestützt durch Untersuchungen, bei denen in Nierenbiopsien von betroffenen Patienten eine erhöhte Expression von miR-150 festgestellt wurde (Zhou et al., 2013). Bei in-vitro Untersuchungen führte eine Überexpression von miR-150 zu einer Herunterregulation des antifibrotischen Protein Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)-Gens und zur Heraufregulation von profibrotischen Proteinen im proximalen Tubulus und Mesangialzellen (Zhou et al., 2013). Es konnte zudem demonstriert werden, dass TGF- $\beta$ 1 die Expression von miR-150 induziert (Zhou et al., 2013). Als wichtige Überlegung bleibt festzuhalten, dass miR-150 nach Durchführung grösserer Studien auch als diagnostischer Marker für die intrarenale Fibrose verwendet werden könnte (Zhou et al., 2013).

*TGFBR2* stellt sich unter anderem als Target von miR-301a dar, womit miR-301a möglicherweise mit dem TGF- $\beta$ -Pathway interagiert (<http://www.targetscan.org/>). Allerdings finden sich in der Literatur bisher weder Angaben zu solchen Interaktionen noch ein Einfluss von miR-301a auf renale Erkrankungen. Es konnte eine signifikante Steigerung der Expression von miR-301a bei der MWF-Ratte im Zeitverlauf bestimmen. In nachfolgenden Untersuchungen könnte erforscht werden, ob diese Expressionsveränderung für die Entwicklung von Nierenerkrankungen bei der MWF-Ratte von Relevanz ist.

Mehrere Arbeitsgruppen identifizierten miR-194 als miRNA, die besonders in der Niere stark exprimiert wird (Sun et al., 2004). Bei der MWF-Ratte verzeichnet miR-194 einen signifikanten Anstieg im Zeitverlauf, allerdings blieb die Expression in beiden untersuchten Zeitabschnitten signifikant unter der des SHR-Stamms. MiR-194 wird unter anderem als möglicher Biomarker für den renalen Reperfusionsschaden bei Ratten diskutiert (Wang et al., 2014). Darüber hinaus ist miR-194 möglicherweise in der Inhibition der Tumorprogression beim klarzelligen Nierenkarzinom involviert (Khella et al., 2013). Es bleibt jedoch Gegenstand zukünftiger Studien einen Zusammenhang zwischen miR-194 und Albuminurie nachzuweisen.

Für miR-347, miR-497 und let-7i gibt es nach dem aktuellen Forschungsstand zufolge bislang keinen Zusammenhang zur Entwicklung von Erkrankungen der Niere. SNPs in der miRNA-Sequenz könnten Einfluss auf verschiedene biologische Prozesse haben, in dem die Expression oder auch die Auswahl der Ziel-mRNAs der miRNAs verändert werden (Iwai & Naraba, 2005). Die Sequenzbewertung der untersuchten miRNAs ergab keine SNPs für MWF und SHR. Saunders et al. stellen in ihren Untersuchungen fest, dass SNPs in pre-miRNA-Sequenzen relativ selten vorkommen (Saunders et al., 2007). Sie vermuten, dass Mutationen in der Sequenz von miRNAs kaum toleriert werden, da miRNAs als eine der wichtigsten Regulatoren gelten und eine einzelne miRNA Einfluss auf die Regulation vieler Gene ausüben kann (Saunders et al., 2007). Ein Beispiel für einen SNP bei der miRNA wurde in einer anderen Studie gezeigt, bei der ein SNP im miR-k5 precursor stem-loop zu einer verringerten Prozessierung durch Drosha führte und damit zu einer verringerten miRNA-Expression (Gottwein et al., 2006). Bei Drosha handelt es sich um ein RNase III Enzym, das als Teil eines Enzymkomplexes im Nukleus die pri-miRNA in pre-miRNA prozessiert. MiRNAs können durch Bindung an die 3'-UTR von mRNA-Transkripten die Translation unterdrücken. Somit besteht die Vermutung, dass ein SNP der Targetsequenz in der 3'-UTR von mRNAs dazu führen kann, dass die Expression des Proteins verändert wird (Saunders et al., 2007). Ein weiterer möglicher Grund für veränderte miRNA-Expressionen ist die epigenetische Regulation, in dem die Promotorregion von miRNAs methyliert und hierüber die Expression der miRNAs verändert wird (Leibowitz-Amit et al., 2012). Bei vielen Tumorarten ist die Promoterregion vom Tumorsuppressor miR-34a methyliert und damit die Expression herunterreguliert (Lodygin et al., 2008). Die Regulation der miRNAs kann auch durch Transkriptionsfaktoren erfolgen. Diese können in sogenannte

autoregulatorische Feedback Loops die Expression von miRNAs erhöhen oder erniedrigen (Krol et al., 2010). Die weitere Erforschung der Regulation von miRNAs wird in Zukunft an Bedeutung gewinnen, da sie eine wichtige Rolle zum Beispiel in der Entwicklung von Organismen, der Zelldifferenzierung und dem Stoffwechsel spielen (Krol et al., 2010). Diese Erkenntnisse sind wichtig, um potentielle Dysregulationen der miRNAs bei Erkrankungen, zum Beispiel der Niere besser zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche SNPs der untersuchten miRNAs beim MWF- und SHR-Stamm ausgeschlossen. Aufgrund dessen sollte in nachfolgenden Untersuchungen überprüft werden, ob zum Beispiel eine epigenetische Regulation oder Transkriptionsfaktoren Ursache für die veränderte Expression der bestätigten miRNAs sind.

MiRNAs sind in der Lage die Expression von 30 % der protein-kodierenden Gene zu regulieren (Haver et al., 2010). In den letzten Jahren ergaben Forschungen, dass miRNAs in zahlreichen Erkrankungen dysreguliert sind und die Expression von krankheitsrelevanten Genen beeinflussen können (Kato et al., 2012). Damit spielen miRNAs eine möglicherweise bedeutende Rolle in der Pathogenese von renalen Erkrankungen (Krutzelfeldt et al., 2005; Saal et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von genomweiten Analysen 11 miRNAs in der Niere des MWF-Rattenmodells ermittelt werden, die einen möglichen altersabhängigen Einfluss auf die Entwicklung von Albuminurie haben könnten. MiR-21 weist beispielsweise eine grosse Relevanz in der Entstehung von Nierenerkrankungen auf, welche bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte (Zhong et al., 2011). Auch konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante altersabhängige Expressionssteigerung von miR-21 bei der MWF-Ratte nachgewiesen werden. MiR-21 stellt sich somit als möglicher Kandidat für eine Targetingtherapie oder als diagnostischer Biomarker dar. MiR-200a, welche eine signifikant niedrigere Expression bei MWF als dem nierengesunden Referenzstamm SHR aufweist, bietet in Zukunft Potential für Entwicklungen von antifibrotischen Targetingtherapien (Meng et al., 2013)

Aufgrund der steigenden Prävalenz von renalen Erkrankungen und damit assoziiert dem Einfluss auf die kardiovaskulären Mortalität, sollte der Fokus der weiteren Forschung darauf liegen, weitere essentielle miRNAs für renale Prozesse zu detektieren und die tierexperimentellen Resultate langfristig in Form von Humanstudien

zu überprüfen. MiRNAs, die eine wichtige Funktion in der Entwicklung von renalen Erkrankungen erfüllen, könnten als diagnostische Biomarker genutzt werden, um bereits in einem frühen Stadium von Nierenerkrankungen therapeutisch intervenieren zu können. Darüber hinaus könnten langfristig miRNAs eine völlig neue Dimension an Therapieoptionen bieten, indem sie als Therapieziel genutzt werden und damit direkt in Pathways von diversen renalen Erkrankungen eingreifen.

## 6 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildungen
ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer
Anova	Analysis of Variance, Varianzanalyse
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AT1-Rezeptorblocker	Angiotensin 1-Rezeptorblocker
ca.	circa
CBF	Campus Benjamin Franklin
cDNA	komplementäre DNA
cM	centi Morgan
Ct-Wert	cycle threshold-Wert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal (or critical) region 8
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
et al.	et alia
FU/Fub	Freie Universität Berlin
g	Gramm
Gene acc.	Gene accession number
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
IgA	Immunglobulin A
kg	Kilogramm
l	Liter
LOD	Logarithm of the odds, Wahrscheinlichkeit der Genkopplung
m	Milli
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
M	Molar
Mio	Million
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mRNA	messenger ribonucleic acid
miRNA	micro ribonucleic acid
nm	Nanometer
Onkomir	onkogene miRNA
p	p-Wert
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
pH	pH-Wert

RNA	Ribonukleinsäure
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierter Bereich
vs.	versus
Wo	Woche
Ztm	Zentrales Tierlaboratorium Medizinische Hochschule Hannover

## 7 Literaturverzeichnis

Aguilar MI, O'Meara ES, Seliger S, et al. Albuminuria and the risk of incident stroke and stroke types in older adults. *Neurology* 2010; 75: 1343-1350.

Bagga A, Mantan M. Nephrotic syndrome in children. *Indian Journal of medical research* 2005; 122: 13-28.

Barzilay JI, Peterson D, Cushman M, et al. The relationship of cardiovascular risk factors to microalbuminuria in older adults with or without diabetes mellitus or hypertension: the cardiovascular health study. *American Journal of Kidney Diseases* 2004; 44: 25-34.

Becker GJ, Hewitson TD. The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9: 133-138.

Benninghoff A, Drenckhahn D. Anatomie. Band 1. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2008; 17. Auflage.

Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003; 35: 215-217.

Butz H, Rácz K, Hunyady L, Patócs A. Crosstalk between and TGF- $\beta$  signaling and the microRNA machinery. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 382-393.

Blahna MT, Hata A. Regulation of miRNA biogenesis as an integrated component of growth factor signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25: 233-240.

Border WA, Noble NA. Evidence that TGF- $\beta$  should be a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1998; 54: 1390-1391.

Böttinger EP, Bitzer M. TGF- $\beta$  Signaling in Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002; 13: 2600-2610.

Brenu EW, Ashton KJ, van Driel M, et al. Cytotoxic lymphocyte microRNAs as prospective biomarkers for Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *Journal of Affective Disorders* 2012; 141: 261-269.



Budoff MJ, Rader DJ, Reilly MP, et al. Relationship of Estimated GFR and Coronary Artery Calcification in the CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) Study. *American Journal of Kidney Diseases* 2011; 58: 519-526.

Chen S-J, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M, Varga J. Stimulation of Type I Collagen Transcription in Human Skin Fibroblasts by TGF- $\beta$ : Involvement of Smad 3. 1999; 112: 49-57.

Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010; 375: 2073-2081.

Chung ACK, Huang XR, Meng X, Lan HY. MiR-192 mediates TGF- $\beta$ /Smad3-driven renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2010; 21: 1317-1325.

Chung ACK, Dong Y, Yang W, Zhong X, Li R, Lan HY. Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF- $\beta$ /Smad3-regulated microRNAs. *Molecular Therapy* 2013; 21: 388-398.

Cowley AW, Roman RJ, Jacob HJ. Application of chromosomal substitution techniques in gene-function discovery. *The Journal of Physiology* 2004; 554: 46-55.

De Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 443-453.

De Zeeuw D, Parving H-H, Henning RH. Microalbuminuria as an Early Marker for Cardiovascular Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006; 17: 2100-2105.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584.

Deshpande SD, Putta S, Wang M, et al. Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Cross Talk Between p53 and a MicroRNA in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2013; 62: 3151-3162.

Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet* 2013; 382: 158-169.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102-114.

Fujimoto M, Maezawa Y, Yokote K, et al. Mice lacking Smad3 are protected against streptozotocin-induced diabetic glomerulopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 305: 1002-1007.

Gachon C, Mingam A, Charrier B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany* 2004; 55: 1445-1454.

Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M, et al. Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011; 80: 93-104.

Ganten D, de Jong W. Experimental and genetic models of hypertension. In: Ganten D, de Jong W, eds. *Handbook of Hypertension*. Elsevier Science B.V., 1994; Vol. 16.

Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, et al. Coronary-Artery Calcification in Young Adults with End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis. *New England Journal of Medicine* 2000; 342: 1478-1483.

Gottwein E, Cai X, Cullen BR. A Novel Assay for Viral MicroRNA Function Identifies a Single Nucleotide Polymorphism That Affects Drosha Processing. *Journal of Virology* 2006; 80: 5321-5326.

Hans FP, Moser M, Bode C, Grundmann S. MicroRNA regulation of angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2010; 20: 253-262.

Haver VG, Slart RH, Zeebregts CJ, et al. Rupture of vulnerable atherosclerotic plaques: microRNAs conducting the orchestra? *Trends Cardiovasc Med* 2010; 20: 65-71.

Herold G: *Innere Medizin*. Herold, G. Köln, 2014.

Iwai N, Naraba H. Polymorphisms in human pre-miRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 331: 1439-1444.

Kato M, Dang V, Wang M, et al. TGF- $\beta$  Induces Acetylation of Chromatin and of Ets-1 to Alleviate Repression of miR-192 in Diabetic Nephropathy 2013; 6: ra43.

Kato M, Park JT, Natarajan R. MicroRNAs and the glomerulus. *Experimental Cell Research* 2012; 318: 993-1000.

Khella HWZ, Bakhet M, Allo G, et al. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2013; 34: 2231-2239.

Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genetics* 2013; 54: 391-406.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research* 2014; 42(Database issue):D68-D73.

Kreutz R, Hubner N. Congenic Rat Strains Are Important Tools for the Genetic Dissection of Essential Hypertension. *Semin Nephrol* 2002, 22: 135-147.

Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, et al. Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J Hypertens* 2000; 18: 777-782.

Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 597-610.

Krupa A, Jenkins R, Luo DD, Lewis A, Phillips A, Fraser D. Loss of MicroRNA-192 Promotes Fibrogenesis in Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2010; 21: 438-447.

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with antagomirs. *Nature* 2005; 438: 685-689.

Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D. Novel drugs and intervention strategies for the treatment of chronic kidney disease. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2013; 76: 536-550.

Lan HY. Diverse Roles of TGF- $\beta$ /Smads in Renal Fibrosis and Inflammation. *International Journal of Biological Sciences* 2011; 7:1056-1067.

Leibowitz-Amit R, Sidi Y, Avni D. Aberrations in the micro-RNA biogenesis machinery and the emerging roles of micro-RNAs in the pathogenesis of cutaneous malignant melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2012; 25: 740-757.

Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 2008; 7: 2591-2600.

Long J, Wang Y, Wang W, Chang BHJ, Danesh FR. MicroRNA-29c Is a Signature MicroRNA under High Glucose Conditions That Targets Sprouty Homolog 1, and Its in Vivo Knockdown Prevents Progression of Diabetic Nephropathy. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 11837-11848.

Luo Y, Wang C, Chen X, et al. Increased Serum and Urinary MicroRNAs in Children with Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Clinical Chemistry* 2013; 59: 658-666.

Massagué J, Wotton D. New EMBO Member's Review: Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signaling system. *The EMBO Journal* 2000; 19: 1745-1754.

Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clinical Science* 2013; 124: 243–254.

MiRBase 20. (Accessed July 26, 2012, at <http://www.mirbase.org/>).

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105: 10513-10518.

Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. *The Journal of Pathology* 2008; 216: 418-427.

Noone D, Licht C. Chronic kidney disease: a new look at pathogenetic mechanisms and treatment options. *Pediatr Nephrol* 2014; 29: 779-792.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27: 282-293.

Ossareh S. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: Mechanisms and Clinical Implications. *Iran J Kidney Dis* 2011; 5: 285-299.

- Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S. Physiologie. Thieme Verlag Stuttgart, 2014; 7. Auflage.
- Patel V, Noureddine L. MicroRNAs and fibrosis. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2012; 21: 410-416.
- Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 77-88.
- Putta S, Lanting L, Sun G, Lawson G, Kato M, Natarajan R. Inhibiting MicroRNA-192 Ameliorates Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2012; 23: 458-469.
- Qin W, Chung ACK, Huang XR, et al. TGF- $\beta$ /Smad3 Signaling Promotes Renal Fibrosis by Inhibiting miR-29. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22: 1462-1474.
- Rapp JP. Genetic Analysis of Inherited Hypertension in the Rat. *Physiol Rev* 2000; 80: 135-172.
- Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of Progressive Nephropathies. *New England Journal of Medicine* 1998; 339: 1448-1456.
- RGSC v3.4 Rat Genome Sequencing Consortium v3.4. (Accessed July 30, 2012, at <http://www.rgd.mcgill.edu/>).
- Saal S, Harvey SJ. MicroRNAs and the kidney: coming of age. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2009; 18: 317-323.
- Saunders MA, Liang H, Li W-H. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104: 3300-3305.
- Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, et al. Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Frömter rat. *Physiol Genomics* 2008; 35: 30-35.
- Schulz A, Kreutz R. Mapping genetic determinants of kidney damage in rat models. *Hypertens Res* 2012; 35: 675-694.

Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic Dissection of Increased Urinary Albumin Excretion in the Munich Wistar Frömter Rat. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002; 13: 2706-2714.

Schulz A, Standke D, Kovacevic L, et al. A Major Gene Locus Links Early Onset Albuminuria with Renal Interstitial Fibrosis in the MWF Rat with Polygenetic Albuminuria. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; 14: 3081-3089.

Schulz A, Weiss J, Schlesener M, et al. Development of Overt Proteinuria in the Munich Wistar Frömter Rat Is Suppressed by Replacement of Chromosome 6 in a Consomic Rat Strain. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 18: 113-121.

Sun Y, Koo S, White N, et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Research* 2004; 32: e188.

Szeto C-C, Ching-Ha KB, Ka-Bik L, et al. Micro-RNA Expression in the Urinary Sediment of Patients with Chronic Kidney Diseases. *Disease Markers* 2012; 33: 137-144.

Tang Q, Zhong H, Xie F, Xie J, Chen H, Yao G. Expression of miR-106b-25 induced by salvianolic acid B inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in HK-2 cells. *European Journal of Pharmacology* 2014; 741: 97-103.

Targetscan Release 6.2. (Accessed August 19, 2012, at <http://www.targetscan.org/>)

Tonelli M, Wiebe N, Culeton B, et al. Chronic Kidney Disease and Mortality Risk: A Systematic Review. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006; 17: 2034-2047.

U.S. Renal Data System, *USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013.

Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P, et al. E-Cadherin Expression Is Regulated by miR-192/215 by a Mechanism That Is Independent of the Profibrotic Effects of Transforming Growth Factor- $\beta$ . *Diabetes* 2010b; 59: 1794-1802.

Wang B, Koh P, Winbanks C, et al. miR-200a Prevents Renal Fibrogenesis Through Repression of TGF- $\beta$ 2 Expression. *Diabetes* 2011; 60: 280-287.

Wang B, Komers R, Carew R, et al. Suppression of microRNA-29 Expression by TGF- $\beta$ 1 Promotes Collagen Expression and Renal Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2012a; 23: 252-265.

Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, et al. Intrarenal expression of microRNAs in patients with IgA nephropathy. *Lab Invest* 2009; 90: 98-103.

Wang G, Kwan BC-H, Lai FM-M, et al. Intrarenal Expression of miRNAs in Patients With Hypertensive Nephrosclerosis. *American Journal of Hypertension* 2010a; 23: 78-84.

Wang H, Peng W, Ouyang X, et al. Reduced circulating miR-15b is correlated with phosphate metabolism in patients with end-stage renal disease on maintenance hemodialysis. *Renal Failure* 2012b; 34: 685-690.

Wang J-f, Yi-feng Z, Li H-w, et al. Screening plasma miRNAs as biomarkers for renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2014; 20: 283-289.

Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor- $\beta$  and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology* 2005; 10: 48-56.

Xiong M, Jiang L, Zhou Y, et al. The miR-200 family regulates TGF- $\beta$ 1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302: F369-379.

Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of Tubulointerstitial Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2010; 21: 1819-1834.

Zhdanova O, Srivastava S, Di L, et al. The inducible deletion of Drosha and microRNAs in mature podocytes results in a collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 2011; 80: 719-730.

Zhong X, Chung ACK, Chen H-Y, Meng X-M, Lan HY. Smad3-Mediated Upregulation of miR-21 Promotes Renal Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22: 1668-1681.

Zhou H, Hasni SA, Perez P, et al. miR-150 Promotes Renal Fibrosis in Lupus Nephritis by Downregulating SOCS1. *Journal of the American Society of Nephrology* 2013; 24: 1073-1087.



## 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Viktor Kebede, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Bedeutung der glomerulären Expression von miRNAs bei der Munich Wistar Frömter-Ratte** 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](http://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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, 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.“

01.03.2016

## **9 Lebenslauf**

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



## **10 Publikation**

Kebede V, Friedrich J, Rühle F, Stoll M, Kreutz R, Schulz A (2012): Identifizierung von microRNAs im Glomerulum der Munich Wistar Frömter-Ratte mit progressiver Albuminurie-Entwicklung. 36. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruck-Liga e.V./ DHL Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention; Berlin. Poster-Präsentation

## **11 Danksagung**

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie und die Bereitstellung dieser Dissertation.

Frau Dr. Angela Schulz möchte ich im Besonderen danken für die immer zuverlässige und ausgesprochen geduldige Betreuung. Diese Arbeit wäre ohne ihr Engagement in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank für eine exzellente Einarbeitung in die Methodik und viele konstruktive Gespräche im Labor geht an Frau Sabine Wunderlich und Frau Claudia Plum. Sie haben stets für eine ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt.

Mein großer Dank geht an meine Eltern, die mich durch die gesamte Studiumszeit sowie während der Anfertigung der Dissertation motiviert haben und mit allen Kräften an meiner Seite standen.