

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

DISSERTATION

Analyse glomerulärer microRNA bei der MWF-Ratte – einem genetischen
Tiermodell für chronische Nierenerkrankungen mit Albuminurie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Fredrich
aus Berlin, Deutschland

Datum der Promotion: 26.06.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungen	5
Abkürzungen Gene	6
Zusammenfassung	7
Abstract	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Die Niere – Funktion und Erkrankungen.....	10
1.1.1 Albuminurie	12
1.2 Ratten als genetisches Modell.....	13
1.2.1 Der Rattenstamm Munich Wistar Frömter.....	13
1.2.2 Der Rattenstamm Spontaneously Hypertensive Rat.....	14
1.3 Detektierte Albuminurie-QTL im Genom der MWF-Ratte	14
1.4 Entdeckung, Synthese und Funktion von microRNA	16
1.4.1 Synthese und Interaktion von microRNA mit der Target-mRNA	17
1.4.2 Funktion von microRNA in der Niere.....	20
1.5 Ziel der Arbeit	21
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Betäubungsmittel	23
2.1.3 Analyse-Kits	23
2.1.4 PCR Master Mix.....	23
2.1.5 MicroRNA Assays und Primer für RT-qPCR.....	23
2.1.6 Sonstige Materialien	24

2.1.7	Geräte	24
2.2	Zucht und Haltung der Tiere	25
2.2.1	Haltung	25
2.2.2	Zucht von MWF und SHR	25
2.3	Präparation und Isolierung der Glomeruli	26
2.4	Extraktion der microRNA aus den Glomeruli	26
2.5	Microarray-Profilig	28
2.6	cDNA Synthese	29
2.7	RT-qPCR-Assays	29
2.8	Kartierung und Target Prediction Tools	30
2.9	Statistische Auswertungen	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Microarray-Profilig-Analysen der microRNA	32
3.2	Konfirmierung der microRNA durch RT-qPCR	33
3.2.1	microRNA mit erhöhtem Fold Change im Alter von 8 Wochen	34
3.2.2	microRNA mit einem erniedrigten Fold Change im Alter von 8 Wochen	41
3.2.3	microRNA in der 24 Wochen alten Gruppe	44
3.3	Kartierungen der microRNAs in Albuminurie-QTL beim MWF-Rattenstamm ...	47
3.4	Target-Gene der differentiell exprimierten und konfirmierten microRNA	49
4.	Diskussion	51
5.	Literaturverzeichnis	67
6.	Eidessstattliche Versicherung	81
7.	Lebenslauf	82
8.	Danksagung	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Albuminurie-QTL bei der MWF-Ratte	15
Abbildung 2: Genregulation durch MicroRNA	17
Abbildung 3: Biogenese von microRNA.....	19
Abbildung 4: Prinzip der Re-Ratio-Berechnung zur Ermittlung des Fold Changes für die Microarray-Analyse von microRNA.....	28
Abbildung 5: Identifizierung der microRNA miR-150	34
Abbildung 6: Identifizierung der microRNA miR-347	35
Abbildung 7: Identifizierung der microRNA miR-497	36
Abbildung 8: Identifizierung der microRNA miR-351	37
Abbildung 9: Identifizierung der microRNA miR-451	38
Abbildung 10: Identifizierung der microRNA miR-195	39
Abbildung 11: Identifizierung der microRNA miR-145	40
Abbildung 12: Identifizierung der microRNA miR-200A	41
Abbildung 13: Identifizierung der microRNA miR-192	42
Abbildung 14: Identifizierung der microRNA miR-194	43
Abbildung 15: Identifizierung der microRNA miR-130A	44
Abbildung 16: Identifizierung der microRNA miR-151-5p	45
Abbildung 17: Identifizierung der microRNA miR-146A	46
Abbildung 18: Lokalisierung confirmierter microRNA in Bezug auf bekannte Albuminurie-QTL	48
Abbildung 19: Lokalisierung der confirmierten microRNA auf Chromosomen ohne bekannte Albuminurie-QTL.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einstellungen zur Anfrage in der miRGate-Datenbank.	31
Tabelle 2: Vergleich zwischen MWF und SHR der 8. Woche im Microarray.	32
Tabelle 3: Vergleich zwischen MWF24. Woche und SHR 24. Woche im Microarray. ...	32
Tabelle 4: Kartierung der confirmierten microRNA im Genom der MWF-Ratte.	47
Tabelle 5: Target-Gene im Albuminurie-QTL auf RNO6.	49

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
γ	Gamma
Abb.	Abbildung
Anova	Analysis of Variance, Varianzanalyse
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ca.	Circa
CBF	Charité Campus Benjamin Franklin
cDNA	Komplementäre DANN
CI	Chronicity Index
cM	Centi Morgan
Ct-Wert	cycle threshold-Wert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
et al.	et alia
Fub	Freie Universität Berlin
g	Gramm
gene acc.	Gene accession number
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
IgA	Immunglobulin A
kg	Kilogramm
KO-Tiere/-Mäuse	(gen-) knockout Tiere/Mäuse
l	Liter
m	Milli
m ²	Quadratmeter
M	Molar
Mio	Million
microRNA-ID	microRNA-Identifikator (MirBase)
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
miRNA	micro Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Tiere
nm	Nanometer
p	p-Wert
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
RT-qPCR	quantitative Realtime PCR
QTL	Quantitative Trait Locus, Region eines quantitativen Merkmals
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	standard error of the mean, Standardfehler

T	Prüfgröße
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ztm	Zentrales Tierlaboratorium Medizinische Hochschule Hannover

Abkürzungen Gene

Aldh6A1	Aldehyde Dehydrogenase 6 Family Member A1
Angel1	Angel Homolog 1
Ccdc176	Coiled-Coil Domain Containing 176
Elmsan1	ELM2 and Myb/SANT-like Domain Containing 1
Flvcr2	Feline Leukemia Virus Subgroup C Cellular Receptor Family 2
Fos	Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
Gstz1	Glutathione S-Transferase Zeta 1
Ltbp2	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2
Nek9	NIMA Related Kinase 9
Ngb	Neuroblobin
Npc2	NPC intracellular cholesterol transporter 2
Pgf	Placental Growth Factor
Pomt2	Protein O-mannosyltransferase 2
Ptgr2	Prostaglandin Reductase 2
Rgd1310769	Ergosterol Biosynthesis 28 Homolog
Tgfb3	Transforming Growth Factor, Beta 3
Vsx2	Visual System Homeobox 2
Ylpm1	YLP Motif Containing 1
Zfyve1	Zinc Finger FYVE-Type Containing 1

Zusammenfassung

Die Identifizierung von microRNA und ihre Funktionsweisen unterliegen weltweit intensiver Forschung. MicroRNA sind kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, die durch Watson-Crick-Basenpaarung an der Target-mRNA die Translation inhibieren. Hierbei kann eine microRNA mehrere Gene gemeinsam mit weiteren microRNA regulieren. Es ist bereits bekannt, dass durch microRNA pathologische Vorgänge in Zellen bei verschiedenen Erkrankungen moduliert werden können.

Zur Untersuchung der Rolle von microRNA bei chronischen Nierenerkrankungen und Albuminurie ist die Munich Wistar Frömter-Ratte (MWF-Ratte) ein geeignetes Tiermodell. Sie entwickelt u. a. eine spontane progressive Albuminurie bei moderater Hypertonie. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten 11 Quantitative Trait Loci (QTL) für Albuminurie im Genom der MWF-Ratte detektiert werden. In der vorliegenden Dissertation sollen in diesen QTL microRNA bzw. ihre Target-Gene identifiziert werden, die eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer Albuminurie bei MWF-Ratten spielen.

Hierfür wurde ein Microarray-Profilung der aus den extrahierten Glomeruli-Isolaten von MWF-Ratten gewonnenen microRNA durchgeführt und die microRNA quantifiziert. Als Referenzstamm dienten Glomeruli-Isolate des Referenzstamms SHR. Das Alter der Tiere wurde auf 8 beziehungsweise 24 Wochen festgelegt, da in diesen Altersstufen eine progressive Albuminurie beim MWF-Modell beobachtet wird. Die anschließende Konfirmierung der differentiell exprimierten microRNA erfolgte mittels quantitativer Realtime-PCR.

Von den im Microarray-Profilung ermittelten 13 microRNA mit gesteigerten oder geminderten Expressionsleveln konnten insgesamt neun microRNA konfirmiert werden. Im Alter von acht Wochen wiesen insgesamt fünf microRNA miR-150, miR-497, miR-351, miR-145, miR-195 einen Expressionsanstieg und drei microRNA miR-200a, miR-192, miR-194 einen Expressionsabfall auf. Im Alter von 24 Wochen konnte nur für miR-130a eine verminderte Expression im Vergleich zum gleichalten SHR-Stamm in der Konfirmierungsanalyse detektiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die identifizierten und konfirmierten microRNA nicht in einem der bekannten Albuminurie-QTL der MWF-Ratte kartieren. Daher wurden diese microRNA mittels algorithmischer Analyse mit in einem wichtigen

QTL auf Rattenchromosom 6 kartierenden Genen abgeglichen. Die microRNA wurden einzeln in Bezug auf ihr pathologisches Potential und in Bezug auf ihre jeweilige Pathogenität in der Niere im Kontext des aktuellen wissenschaftlichen Standes intensiv diskutiert.

Die in dieser Dissertation identifizierten microRNA könnten als Grundlage für weitere experimentelle Arbeiten zur Klärung von genetischen Ursachen von chronischen Nierenerkrankungen bzw. Albuminurie, als Biomarker renaler Prozesse oder Targeting-Therapien zur Behandlung von Krankheiten wie Neoplasien oder chronischen Organveränderungen dienen.

Abstract

The identification of microRNA and their way of functioning are the object of intense research. MicroRNA are small, non-coding RNA molecules that inhibit translation of the target-mRNA via Watson-Crick base pairing. One micro-RNA can regulate several genes together with further microRNA. It is known that pathological processes in cells can be modulated by microRNA.

The Munich Wistar Frömter rat (MWF) is an adequate model for research on the role of microRNA in chronic kidney diseases and albuminuria. It develops spontaneous progressive albuminuria and mild hypertension. The work group's preceding research detected eleven Quantitative Trait Loci (QTL) for albuminuria in the genome of the MWF rat. This dissertation aims to identify microRNA or their target genes in these QTL that play an important role for the development of albuminuria in MWF rats.

To this end, a microarray-profiling was conducted of the microRNA obtained from the extracted glomeruli-isolates of MWF-rats, and thus the microRNA were quantified. The glomeruli isolates of the SHR rat served as a reference strain. The animals were either eight or twenty-four weeks old, as these are the ages at which one can observe a progressive albuminuria in the MWF model. The subsequent confirmation of the differentially expressed microRNA was carried out via quantitative Realtime-PCR.

Of the thirteen microRNA that were detected through the microarray-profiling, nine microRNA were confirmed. At the age of eight weeks, a total of five microRNA showed an increase in expression: miR-150, miR-497, miR-351, miR-145, miR-195; and three

showed a decrease in expression: miR-200a, miR-192, miR-194. At the age of twenty-four weeks, it was only miR-130a that showed a reduced expression in the confirmation analysis.

The results of this dissertation thesis show that the identified microRNA do not map to any of the known albuminuria-QTL. For this reason, using algorithmic analysis, the identified microRNA were compared to genes that map to rat chromosome 6 in an important QTL. The microRNA were each discussed in detail with reference to their pathological potential as well as to their respective pathogenicity in the kidney in the context of current scientific research.

The microRNA that were identified in this dissertation thesis could serve as a basis for further experimental work that aims to clarify genetic causes of chronic kidney diseases or albuminuria; they can also serve as biomarkers for renal processes or targeting therapies for the treatment of illnesses such as neoplasia or chronic changes in organs.

1. Einleitung

1.1 Die Niere – Funktion und Erkrankungen

Die Nieren sind normalerweise als paariges Organ angelegt. Die wichtigste Funktionseinheit der Niere ist das Nephron, das aus dem Nierenkörperchen mit Glomerulus und Bowman'scher Kapsel und dem Tubulussystem mit proximalem, intermediärem und distalem Tubulus zusammengesetzt ist. Das Tubulussystem drainiert schließlich in das Sammelrohr und von dort gelangt der Urin über das Nierenbecken in die Ureter. Der Mensch besitzt etwa $1,0-1,6 \times 10^6$ Nephrone pro Niere (Herbert Lippert, Lehrbuch Anatomie 6. Auflage). Die Funktionen der Nieren sind vielfältig. Neben der Produktion von Endharn zur Entgiftung des Körpers von Stoffwechselmetaboliten, regulieren die Nieren den Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt des Körpers. Des Weiteren üben die Nieren eine wichtige Funktion auf die Hämodynamik durch Regulierung des Blutdruckes über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aus. Darüber hinaus besitzen die Nieren weitere endokrinologische Eigenschaften durch Produktion von Erythropoetin, wodurch die Erythropoese gesteuert wird. Nicht zuletzt sind die Nieren an der Regulation des Calcium- und Phosphathaushaltes und des Knochenstoffwechsels beteiligt, indem in den Nieren die C¹-Hydroxylierung von 25-Hydroxycholecalciferol zum wirksamen 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol) durchgeführt wird (Herbert Lippert, Lehrbuch Anatomie 6. Auflage).

Die chronische Niereninsuffizienz wird definiert als Nierenfunktionsverschlechterung über einen Zeitraum von drei Monaten mit Einschränkungen des Gesundheitszustandes (KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, <https://kdigo.org>). Um die Schwere der chronischen Niereninsuffizienz und deren Prognose beschreiben zu können, nutzt die aktuelle Nomenklatur der Arbeitsgruppe Kidney Disease: Improving Global Outcome (KDIGO) sowohl den Grund für das Nierenversagen, die glomeruläre Filtrationsrate als auch die Albuminurie als wesentliche Merkmale der chronischen Niereninsuffizienz (<http://www.kidney-international.org>, KDIGO 2012). Durch Bestimmung dieser Parameter kann bereits durch die Nomenklatur eine Aussage über die Prognose der Nierenfunktion gemacht werden. Zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate wird in der Klinik zumeist die Clearance von Kreatinin herangezogen. Kreatinin ist ein Muskelabbauprodukt, das in den Glomeruli filtriert und teilweise über das Tubulussystem ausgeschieden wird und damit keine exakte

Aussage über die glomeruläre Funktion ermöglicht. Es unterliegt erheblichen Schwankungen, die von Alter, Gewicht, Größe und Muskelmasse abhängig sind. Ein Blutplasmaspiegel kurz über der pathologischen Grenze von 0,9 mg/dl für Männer beziehungsweise 0,7 mg/dl für Frauen kann bereits mit einer erheblichen Nierenfunktionsverschlechterung einhergehen (<http://www.kidney-international.org>, KDIGO 2012). Aus diesen Gründen haben sich weitere Biomarker zur Beurteilung der Nieren mit besserer Aussagekraft, wie Cystatin C, etabliert oder werden erforscht. Zur Berechnung der glomerulären Filtrationsrate werden abschätzende Formeln verwendet, die neben dem Kreatinin- oder Cystatin-C-Plasmaspiegel auch Größe, Alter, Geschlecht und weitere Parameter verwenden (Modification of Diet in Renal Disease (MDRD), Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) (Levey und Inker, 2017).

Erkrankungen der Niere sind weltweit verbreitet (Jha et al., 2013). Der demographische Wandel in Deutschland führt zu einer stetigen Zunahme der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Neben dem Alter sind die diabetische Nephropathie und die arterielle Hypertonie die häufigsten Ursachen für ein chronisches Nierenversagen (Jha et al., 2013). Eine progrediente chronische Niereninsuffizienz führt im terminalen Stadium zum völligen Verlust der Nierenfunktion und damit zur Dialysepflicht des Patienten. In Deutschland wurden im Erhebungszeitraum 2006/2007 66.508 Patienten mittels extrakorporalem Nierenersatzverfahren behandelt. Das entspricht einer Prävalenz von 808 Dialysepatienten / Millionen Einwohner und damit 39 Patienten / Millionen Einwohner mehr als im Vorjahr (<http://www.bundesverband-niere.de>, Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007). Trotz mittlerweile gut behandelbarer Folgeerkrankungen der chronischen Niereninsuffizienz aufgrund der fehlenden systemischen Funktion der Niere bleiben Folgeschäden bestehen und führen zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität bei betroffenen Patienten (Jha et al., 2013; Lozano et al., 2012). Vor allem trifft dies in Bezug auf die terminale Niereninsuffizienz und das erhöhte kardiovaskuläre Mortalitätsrisiko zu (Tonelli et al., 2006). Doch nicht nur Erkrankungen des Stoffwechsels oder des Kreislaufs führen zu einer chronischen Niereninsuffizienz oder terminalem Nierenversagen. Neben diesen spielen auch Glomerulonephritiden, postrenale Ursachen, soziodemographische Risikofaktoren und genetische Ursachen eine Rolle (Jha et al., 2013).

Aus diesem Grund ist eine Erforschung der zellphysiologischen und pathogenetischen Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz essentiell, um bessere Therapiemöglichkeiten zu schaffen und betroffene Patienten frühzeitig zu identifizieren.

1.1.1 Albuminurie

Zur Bestimmung des Stadiums einer chronischen Niereninsuffizienz wird neben der glomerulären Filtrationsrate die Albuminurie herangezogen (KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, <https://kdigo.org>). Die Albuminurie wird unterteilt in eine Mikroalbuminurie und eine Makroalbuminurie. Von einer Mikroalbuminurie spricht man bei 30-300 mg/24h Albuminausscheidung über den Urin. Darüber liegende Werte zählen dementsprechend als Makroalbuminurie. Die Albuminurie wird verursacht durch eine Störung der Filtrationsfunktion des Glomerulums, kann aber auch durch Fehlfunktionen und Schäden am Tubulussystem induziert werden (Heerspink und Gansevoort, 2015). Der glomeruläre Filtrationsapparat besteht aus den Podozyten, der Basalmembran und dem Gefäßendothel der Kapillaren (Pavenstädt et al., 2003; Tryggvason und Wartiovaara, 2005; Menon et al., 2012). Durch eine gestörte selektive Permeabilität durch pathologische Veränderungen im Filtrationsapparat entsteht eine Albuminurie bis hin zu einer Proteinurie, da die geladenen Proteine nicht mehr ausreichend zurückgehalten werden (Heerspink und Gansevoort, 2015).

Der Albuminurie kommt ein wesentlicher Stellenwert in der Prognoseabschätzung der chronischen Niereninsuffizienz zu (<http://www.kidney-international.org>, KDIGO 2012). Patienten mit Albuminurie haben nicht nur unabhängig von anderen Ursachen eine schlechtere Prognose bezüglich einer terminalen Niereninsuffizienz, sondern auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen (Gansevoort und de Jong, 2009; Gansevoort et al., 2011; Heerspink and Gansevoort, 2015; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, 2010). Damit kommt der Albuminurie eine besondere Bedeutung bei der Nierenfunktionseinschränkung zu.

Die pathogenetischen Grundlagen für Albuminurie sind noch nicht ausreichend erforscht. Bislang konnte über genomweite Assoziationsstudien (GWAS) beziehungsweise Metaanalysen nur Cubilin (CUBN) und RAB38, ein Mitglied der RAS-Genfamilie, für eine Albuminurie-Entwicklung identifiziert werden (Köttgen A et al., 2009; Teumer et al., 2016).

Ein umfassenderes Wissen über die Albuminurie und die genetischen Grundlagen stellt eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Pathophysiologie der Nierenfunktion dar. Ein besseres Verständnis genetischer und pathophysiologischer Varianten und deren Interaktion ist die Aufgabe wissenschaftlicher Forschung. Die Grundlagenforschung kann somit zu einer Erweiterung der diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten zur Therapie vaskulärer und renaler Erkrankungen führen.

1.2 Ratten als genetisches Modell

1.2.1 Der Rattenstamm Munich Wistar Frömter

Die Munich-Wistar-Frömter-Ratte (MWF-Ratte) ist ein Inzuchtrattenstamm, der bereits seit längerer Zeit als Tiermodell für chronische Nierenerkrankungen dient (Kreutz et al., 2000; Hackbarth et al., 1991). Dabei wird sowohl die phänotypische Ausprägung der jeweiligen Erkrankung als auch ihre genetischen Grundlagen untersucht (Kreutz et al., 2000; Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003, Schulz et al., 2019). Die MWF-Ratte wurde für Mikropunktionsstudien zur Untersuchung oberflächlicher Glomeruli gezüchtet (Hackbarth et al., 1983). Im Vergleich zu anderen Stämmen befinden sich relativ viele Glomeruli im Cortex corticis der Nieren (Hackbarth et al., 1983). Außerdem weisen MWF-Ratten eine 30% geringere Anzahl an Nephronen im Vergleich zu Referenzstämmen wie dem SHR-Stamm oder dem Lewis-Stamm auf (Schulz et al., 2007). Weitere charakterisierende Eigenschaften dieses Tiermodells sind eine Proteinurie und Albuminurie, sowie die Entwicklung eines mäßigen arteriellen Hypertonus (Kreutz et al., 2000; Hackbarth et al., 1991). Die Proteinurie und Albuminurie verlaufen bei den MWF-Tieren im Alter progredient (Kreutz et al., 2000, Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Innerhalb des MWF-Stammes zeigte sich ein sexueller Dimorphismus, da die männlichen Tiere eine signifikant höhere Albuminurie aufwiesen als die Weibchen (Schulz et al., 2008). Die Entwicklung der Albuminurie beginnt im Alter von ca. sechs Wochen (Ijpelaar et al., 2008). Der Albuminurie und der fokal segmentalen Glomerulosklerose vorausgehend wurden eine glomeruläre Hypertrophie und der fokale und segmentale Verlust von Podoplanin demonstriert (Ijpelaar et al., 2008). Mittels Kosegregations- und Kopplungsanalysen wurde nachgewiesen, dass die Albuminurie polygenetisch determiniert ist (Schulz et al., 2002, Schulz et al., 2003). Mittlerweile konnte bei der MWF-

Ratte transmembrane protein 63c (*Tmem63c*) als erstes Gen für eine Albuminurie-Entwicklung beziehungsweise für die Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere in der Niere identifiziert werden (Schulz et al., 2019).

1.2.2 Der Rattenstamm Spontaneously Hypertensive Rat

Über Inzucht konnte der Spontaneously Hypertensive Rat-Stamm (SHR) aus einem Wistar-Stamm generiert werden (Okamoto und Aoki, 1963; Schulz et al., 2012). Selektiert wurden dabei die Tiere mit der höchsten arteriellen Hypertonie, welche über mehrere Generationen hinweg konsequent ingezüchtet wurden (Okamoto und Aoki, 1963). Der resultierende Rattenstamm wurde seither weltweit zur Untersuchung von kardiovaskulären Erkrankungen und Pharmakotherapien der arteriellen Hypertonie herangezogen (Kurtz, 1994). Charakterisierend für den SHR-Stamm ist ein isolierter arterieller Hypertonus bis 200 mmHg (Pinto et al., 1998). Der SHR-Stamm wird als kontrastierender Rattenstamm zur MWF-Ratte herangezogen (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2019).

1.3 Detektierte Albuminurie-QTL im Genom der MWF-Ratte

Durch Kosegregations- und Kopplungsanalysen mit kontrastierenden Inzuchtrattenstämmen konnten mehrere Quantitative Trait Loci (QTL) im Genom der MWF-Ratte identifiziert werden (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Für die Analysen wurden zum einen Lewis-Ratten verwendet, die weder einen arteriellen Hypertonus noch pathologische Nephropathien aufweisen, zum anderen SHR-Ratten, die als nierengesund gelten, aber eine arterielle Hypertonie entwickeln. Durch die Analysen mit den Lewis-Ratten konnten vier Albuminurie-QTL für die MWF-Ratte auf den Rattenchromosomen (RNO) 1, 6, 12 und 17 identifiziert werden. In den Analysen mit dem SHR-Stamm waren es acht Albuminurie-QTL, die auf RNO1, 4, 6, 7, 8, 9, 15 und X kartieren (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2012). Der QTL auf RNO6 konnte hierbei in beiden Analysen identifiziert werden und erscheint kolokalisiert (Schulz et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3 dargestellt.

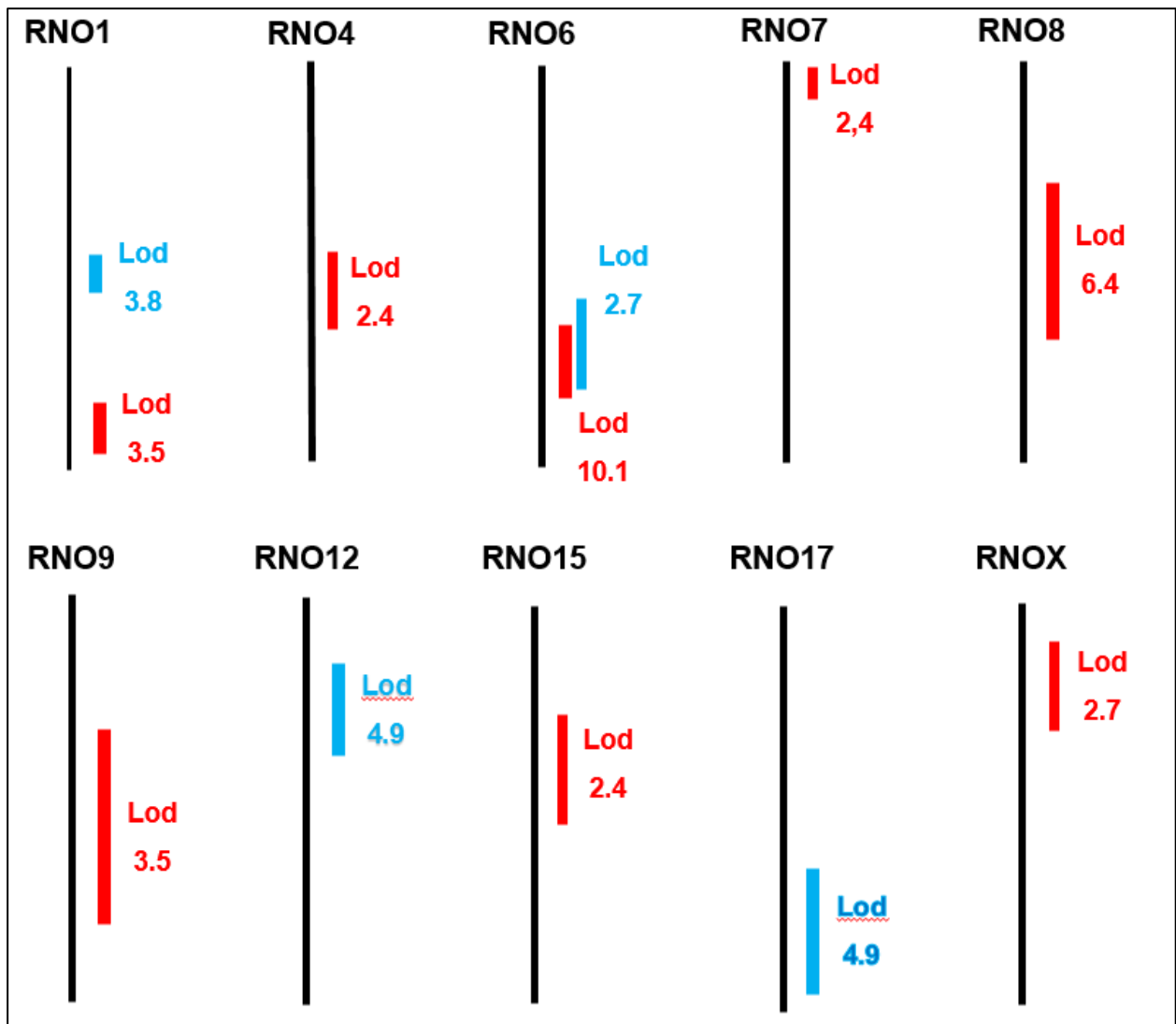


Abbildung 1: **Albuminurie-QTL bei der MWF-Ratte (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003)**. Lokalisation der Albuminurie-QTL mit Angabe des Lod-Scores auf den verschiedenen Chromosomen. Rote Balken: Lod-Score der Kosegregations- und Kopplungsanalysen bei MWF- und SHR-Ratten; blaue Balken: Lod-Score der Kosegregations- und Kopplungsanalysen der MWF- und Lewis-Ratten; LOD, logarithm of the odds; RNO, Chromosom (modifiziert nach Schulz et al., 2002 und 2003).

Der QTL auf RNO6 zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten der Albuminurie bei den untersuchten Tieren. Die Signifikanz der Kopplung des RNO6-QTL zur Albuminurie nahm von der 8. über die 14. und 24. Woche weiter zu. Außerdem bestand ein Zusammenhang von RNO6 zur renalen interstitiellen Fibrose, der Gesamtzahl der Nephrone und der Anzahl der Glomeruli im Cortex corticis der Niere (Schulz et al., 2003, Schulz et al., 2007). Um weitere Aussagen über die Relevanz der

gefundenen QTL auf RNO6 und RNO8 zu machen, wurden konsome Rattenstämme gezüchtet. Mit markergestützter Zucht wurde RNO6 des Referenzstammes SHR in den genetischen Hintergrund von MWF transferiert (MWF-6^{SHR}). Gleiches erfolgte mit RNO8 (MWF-8^{SHR}) (Schulz et al., 2007; Schulz et al., 2008a). Die Ergebnisse der Untersuchungen belegten, dass in beiden konsomen Linien durch den Austausch des jeweiligen Chromosoms die Albuminurie signifikant reduziert werden konnte. Bei MWF-6^{SHR}-Ratten konnte in der 8. Woche die Albuminurie vollständig eliminiert werden.

1.4 Entdeckung, Synthese und Funktion von microRNA

Seit der Entdeckung der microRNA 1993 beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) aus der Gruppe der Rhabditiden wurde sie zum Ziel intensiver Forschung (Lee et al., 1993). 1993 konnte ein Gen identifiziert werden, das für zwei kleine RNA-Moleküle kodierte, die anscheinend einen regulatorischen Einfluss auf das Gen *lin-14* ausübten (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Erst sieben Jahre später wurde eine weitere RNA, *let-7*, identifiziert, die ähnlich der *lin-4*-RNA, einen modulierenden Einfluss bei *C. elegans* aufwies (Reinhart et al., 2000). Seitdem konnten bei vielen weiteren Spezies innerhalb der Mammalia als auch bei Pflanzen zahlreiche microRNA nachgewiesen werden (Pasquinelli et al., 2000; Lagos-Quintana et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2003; Llave et al., 2002). Mittlerweile konnten für den *Homo sapiens* bereits 2.600 verschiedene microRNA identifiziert werden, für die Ratte sind bisher lediglich 807 bekannt (mirBase, v20).

Die eingehende Untersuchung der Funktion von microRNA und ihrer Regulation von Targetgenen hat zu neuen Erkenntnissen für die Entstehung von Krankheiten geführt. Mittlerweile ist bekannt, dass eine microRNA verschiedene Gene regulieren kann (Peter,

2010). Im Gegensatz dazu kann ein Gen ebenso von verschiedenen microRNA reguliert werden (Abb.1).

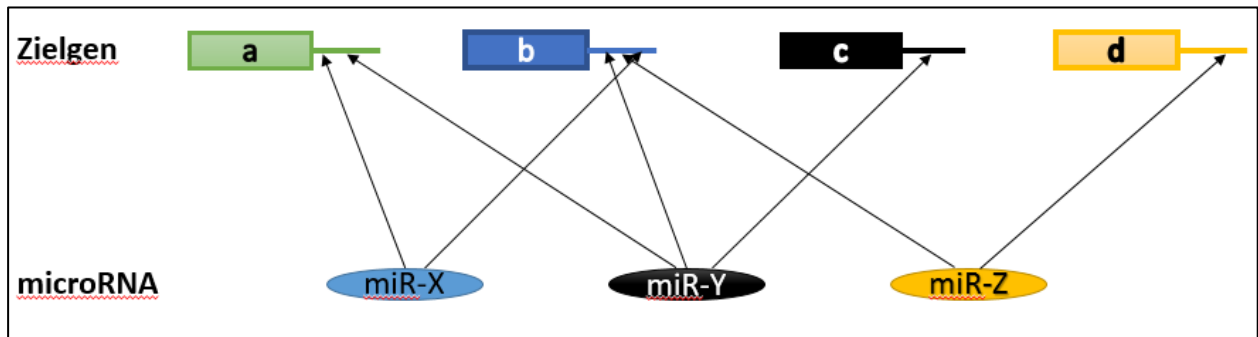


Abbildung 2: **Genregulation durch MicroRNA:** MicroRNA sind in der Lage unterschiedliche Target-Gene durch Bindung an die 3'-UTR zu regulieren. Unterschiedliche MicroRNAs können das gleiche Target-Gen regulieren.

Filipowicz et al. nehmen an, dass mindestens 30% aller protein-kodierenden Gene durch microRNA reguliert werden (Filipowicz et al., 2008). In verschiedenen experimentellen Arbeiten mit Säugetieren und auch einigen Pflanzen konnte gezeigt werden, dass microRNA in den meisten zellulären Prozessen regulierend eingreifen (Lagos-Quintana et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2003; Llave et al., 2002). Die Regulation erfolgt dabei durch Basenpaarung am 3'-UTR von mRNAs, die auf diese Weise die Translation unterbricht oder zur Degradierung der mRNAs führt (Filipowicz et al., 2008).

1.4.1 Synthese und Interaktion von microRNA mit der Target-mRNA

Der Prozess der nachfolgend aufgeführten microRNA-Biogenese ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. MicroRNA sind kleine, einzelsträngige RNA-Moleküle mit variierender Größe. Die Anzahl der Basenpaare reicht dabei von 20 bis zu 24 bp. Sie kodieren dabei nicht für Proteine, sondern regulieren diese (Filipowicz et al., 2008).

Die Gene, die für microRNA kodieren, sind monocystronisch oder polycystronisch und liegen in Clustern mit weiteren microRNA auf dem Genom vor. Sie werden demnach von einem eigenen Promotor oder gemeinsam mit anderen microRNA transkribiert (Blahna und Hata, 2013; Filipowicz et al., 2005; Filipowicz et al., 2005). Dabei liegen etwa 40-70%

der bei Säugetieren identifizierten microRNA in Introns von kodierenden- und nicht-kodierenden Transkripten (Griffith-Jones et al., 2008). Die Transkription von microRNA erfolgt durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II, so dass ein mehrere Kilobasen langes Transkript entsteht, welches primary microRNA genannt wird (pri-miRNA; Abb. 2) (Filipowicz et al., 2005). Am 5'-Ende befindet sich eine 7-Methylguanosin-Kappe und am 3'-Terminus ein Poly-A-Schwanz (Blahna und Hata, 2013). Das Transkript faltet sich in eine charakteristische Haarnadelstruktur (hairpin-structure) (Blahna und Hata, 2013). Hier sind die microRNA als sogenannte Stem-Loops enthalten (Blahna und Hata, 2013). Im Zellkern erfolgt die weitere Prozessierung durch einen nukleären Mikroprozessorkomplex aus der RNase-III-Endonuklease Drosha und dem Doppelstrang-RNA-bindenden Protein DeGeorge critical region-8 (DGCR8, Abb. 2) (Blahna und Hata, 2013; Lee et al., 2003). DGCR8 ist dabei für die Erkennung und Bindung der pri-miRNA zuständig, während Drosha beide Stränge der Haarnadel schneidet, wodurch die precursor microRNA (pre-miRNA) entsteht, die noch etwa eine Länge von 70 Nukleotiden aufweist (Basyuk et al., 2003; de Fougères et al., 2007; Bartel, 2004). Durch Ran-GTP und dem Rezeptorkomplex Exportin-5 erfolgt der aktive Transport durch die Kernmembran in das Zytoplasma (Lund et al., 2004). Im Zytoplasma erfolgt die weitere Prozessierung durch eine RNase-III-Endonuklease, Dicer, in doppelsträngige reife microRNA (mature miRNA) (Lee et al., 2003; Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Die Erkennung der pre-miRNA und die Direktion von Dicer erfolgt ebenfalls durch ein Doppelstrang-RNA-bindendes Protein, das human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein (TRBP; Abb. 2) (Chendrimada et al., 2005). Das kurzlebige miRNA:miRNA*-Produkt, das über die Prozessierung durch Dicer entstanden ist, wird auf Argonaut-Proteine (AGO1-AGO4) geladen und, nach Entwindung der beiden Stränge in „guide strand“ und einen „anti-guide strand“, in den RNA induced silencing complex (RISC) oder auch micro-Ribonukleoprotein (miRNP) transferiert. Dabei wird der „anti-guide strand“ (miRNA*) degradiert (Filipowicz et al., 2008, Blahna and Hata, 2013). Der RISC-Komplex besteht dabei aus miRNA, Dicer, Argonaut-Protein und Protein ACTivator of the interferon-induced protein kinase (PACT). Durch Bindung an die 3'-UTR-Region wird die Target-mRNA entweder degradiert oder die Translation gehemmt (Shukla et al., 2011, de Fougères et al., 2007, Filipowicz et al., 2008). Der genaue Prozess des mRNA-Silencing durch microRNA ist aktuell noch nicht ausreichend erforscht (Shukla et al., 2011). Es wird angenommen, dass die Komplementarität der

microRNA mit der mRNA die Art der Translationshemmung bestimmt (Shukla et al., 2011). Nach dieser Annahme führt eine vollständige Komplementarität zu einer Deadenylierung und der daraus folgenden Degradierung der mRNA in sogenannten processing-bodies. Eine unvollständige Watson-Crick-Basenpaarung führt zur Inhibierung der Translation (Shukla et al., 2011; Filipowicz et al., 2008; de Fougères et al., 2007). Neben diesen beiden Arten der Translationshemmung wurde demonstriert, dass microRNA noch in weitere Prozesse zur Regulierung der Genexpression eingreifen können. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass microRNA Promotorregionen direkt als Ziel haben können (Chekulaeva and Filipowicz, 2009).

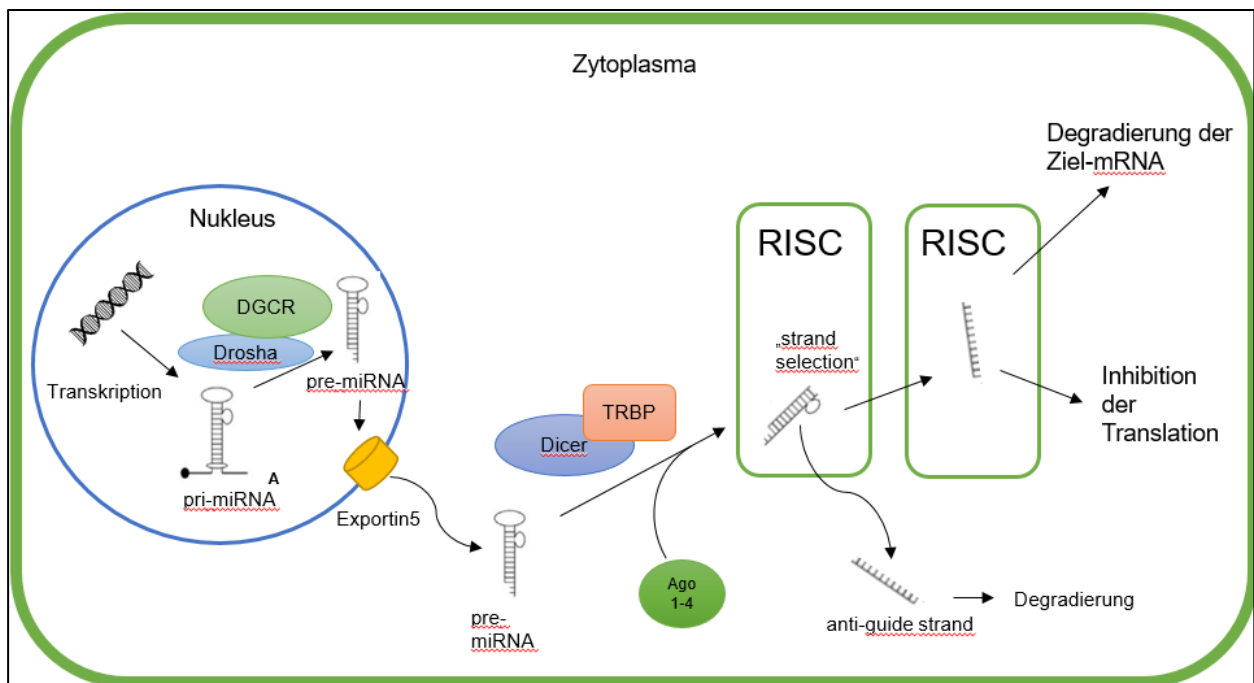


Abbildung 3: **Biogenese von microRNA:** Im Zellkern erfolgt die Transkription in primary miRNA (pri-miRNA) und anschließend die Prozessierung durch den Drosha/DGCR-Komplex in precursor miRNA (pre-miRNA). Pre-miRNA wird durch Exportin5 aus dem Zellkern geschleust. Anschließend erfolgt durch Dicer die Umwandlung in reife microRNA. Durch den RISC-Komplex, bestehend aus Dicer, TRBP, AGO1-4 und der reifen microRNA, erfolgt die Degradierung der Target-mRNA oder die Inhibition der Translation durch Watson-Crick-Basenpaarung an die mRNA. Der „anti-guide strand“ wird ebenfalls degradiert. DGCR, DeGeorge critical region-8; Drosha, RNase-III-Endonuklease; TRBP, human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein; Dicer, RNase-III-Endonuklease; Ago, Argonaut-Proteine 1-4; RISC, RNA induced silencing complex; mRNA, messenger RNA; pri-miRNA, primary microRNA; pre-miRNA, premature microRNA.

1.4.2 Funktion von microRNA in der Niere

Die anfangs den microRNA zugedachte Rolle der Feinregulation des Expressionslevels bestimmter Proteine ist mittlerweile überholt (Ambros, 2004). MicroRNA übernehmen in sehr vielen Pathways Schlüsselrollen. So haben microRNA unter anderem Einfluss auf die embryonale Entwicklung von Organen, den Zellzyklus, hämatopoetische Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellproliferation (Ambros, 2004). Sie sind teilweise hochspezifisch für bestimmte Organe (Lagos-Quintana et al., 2002; Ambros, 2004).

In Studien mit Knockdown-Modellen konnte die fundamentale Rolle von microRNA auch für die Physiologie und Pathophysiologie der Niere nachgewiesen werden. Ein Dicer-Knockdown wurde an Modellen für die Nephronentwicklung, das Ureterepithel, die Podozyten, den proximalen Tubulus und den juxtaglomerulären Apparat beschrieben (Harvey et al. 2008; Shi et al., 2008; Ho et al., 2008; Wie et al., 2010; Sequeira-Lopez et al., 2010). In diesen experimentellen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass ein Fehlen des Enzyms zur Kumulation von pri-miRNA und einem Verlust von mature miRNA führt. Das Fehlen der zur Regulation von Proteinen fähigen microRNA führt wiederum zu pathologischen Veränderungen oder Fehlentwicklungen der Niere (Harvey et al., 2008; Shi et al., 2008; Ho et al., 2008; Wei et al., 2010; Sequeira-Lopez et al. 2010; Ho et al., 2011).

In der erst postnatal entstehenden Niereninsuffizienz, akut und chronisch, konnten Veränderungen in der microRNA-Expriemierung nachgewiesen werden. So konnte an Modellen mit ischämischer Reperusionsverletzung gezeigt werden, dass es zu signifikanten Veränderungen von microRNA-Konzentrationen in der Niere kommt (Wei et al., 2010). Bei Patienten mit IgA-Nephropathie konnten krankheitsspezifische Veränderungen in der renalen microRNA-Expression, als auch im Niveau der im Urin ausgeschiedenen microRNA detektiert werden (Szeto and Li, 2014). Ebenfalls schon vielfach untersucht sind Veränderungen in der microRNA-Expression und deren Folgen für die diabetische Nephropathie (Duan et al., 2017; Lee et al., 2017; Trionfini and Benigni, 2017). Weitere Untersuchungen zu Nierenerkrankungen, wie der fokal segmentalen Glomerulosklerose und der Lupus-Nephritis detektierten signifikante

Veränderungen in der Exprimierung verschiedener microRNA bei den beiden Krankheiten (Trionfini and Benigni, 2017). Dabei konnten sowohl protektive Eigenschaften, als auch schädliche Einflüsse durch verschiedene microRNA ausgemacht werden. Einige microRNA wiesen die Fähigkeit auf im Nierenzellkarzinom als Tumorsuppressor zu agieren, für andere wiederum konnte die Eigenschaften eines Onkogens nachgewiesen werden. Diese microRNA wurden als Onkomir bezeichnet (Pengcheng et al., 2017; Liu et al., 2017; Zhao et al., 2016). In der Therapieresistenz gegenüber Sunitinib, einem Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor, waren microRNA im Nierenzellkarzinom involviert (Yamaguchi et al., 2017). Um microRNA und ihre Eigenschaften als Therapieziele zu nutzen ist es notwendig die zellspezifischen Unterschiede in der Exprimierung einzelner microRNA und deren Wirkung auf die Pathophysiologie der Zelle in den unterschiedlichsten Zell- und Organsystemen zu kennen, um so spezifische oder systemische Therapien entwickeln zu können.

Nicht nur in der - bislang theoretischen - Therapie von Nierenerkrankungen kommt microRNA eine Bedeutung zu. Mittlerweile gibt es viele tierexperimentelle Studien, in denen exkretorische microRNA im Plasma oder Urin bestimmt werden, um eine bessere Detektion von Nephropathien zu ermöglichen. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass microRNA auch als Biomarker für Nephropathien eine vielversprechende Rolle zukommen kann (Nassirpour et al., 2016).

1.5 Ziel der Arbeit

Die chronische Niereninsuffizienz und die Albuminurie sind bedeutende Risikofaktoren für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen und der terminalen Niereninsuffizienz. Durch die Untersuchung der microRNA kann das Verständnis der Ursachen dieser Erkrankungen erweitert werden.

Im Rahmen dieser Dissertation sollen in den Glomeruli der Nieren microRNA identifiziert werden, die zwischen einem Rattenstamm mit progredienter Albuminurie und Nephropathie (MWF-Stamm) und einem nierengesunden Rattenstamm (SHR-Stamm) unterschiedlich exprimiert werden. Als geeignete Methode für die Quantifizierung der microRNA wurde ein Microarray-Profilung durch cDNA-Chiptechnologie mit

anschließender Konfirmierung durch quantitative Realtime-PCR-Assays basierend auf der quantitativen Realtime PCR (RT-qPCR) optimiert und etabliert.

Die identifizierten und konfirmierten microRNA sollen auf ihre Lokalisation im Genom in Bezug auf die bekannten Albuminurie-QTL überprüft werden. Anschließend erfolgt die Identifizierung von Target-Genen im QTL auf Chromosom 6 des MWF-Stamms mittels „Target Prediction Tools“. Identifizierte microRNA sollen mittels einer Datenbankrecherche im Kontext des aktuellen Forschungsstandes bezüglich ihrer Pathogenität evaluiert werden. Von den möglicherweise regulierten und durch die „Target Prediction Tools“ identifizierten mRNA im Albuminurie-QTL auf RNO6 sollen Target-Gene ebenfalls im Kontext des aktuellen Forschungsstandes bewertet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Chloroform	Sigma-Aldrich
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol 100 %	J.T. Baker
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Methanol	J.T. Baker
Natriumchlorid	Merck
Nukleasefreies Wasser	Qiagen
RNase® AWAY	Molecular Bioproducts
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck

2.1.2 Betäubungsmittel

Betäubungsmittel	Hersteller
Esketaminhydrochlorid (KetanestS®) 25 mg/ml	Pfizer
Xylazinhydrochlorid (Rompun®) 2 %	Bayer

2.1.3 Analyse-Kits

Kit	Hersteller
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

2.1.4 PCR Master Mix

PCR Master Mix	Hersteller
TaqMan® Universal PCR Master Mix II, No UNG	Applied Biosystems

2.1.5 MicroRNA Assays und Primer für RT-qPCR

microRNA	Reife miRNA Sequenz/Primer	Hersteller
miR-130a	GCUCUUUUCACAUUGUGCUACU	Life Technologies
miR-145	GUCCAGUUUUCAGGAAUCCCU	Life Technologies
miR-146a	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	Life Technologies

miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	Life Technologies
miR-151-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	Life Technologies
miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	Life Technologies
miR-194	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	Life Technologies
miR-195	UAGCAGCACAGAAAUUUGGC	Life Technologies
miR-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	Life Technologies
miR-347	UGUCCCUCUGGGUCGCCCA	Life Technologies
miR-351	UCCUGAGGAGCCCUUUGAGCCUGA	Life Technologies
miR-497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGUA	Life Technologies
miR-451	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	Life Technologies

2.1.6 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
96-well Optical Reaction Plates	Applied Biosystems
Einwegspritzen aus Kunststoff (2 ml, 5 ml)	Braun
Greiner-Röhrchen (5 ml, 12ml)	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

2.1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
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-Schüttler	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf

2.2 Zucht und Haltung der Tiere

2.2.1 Haltung

Für diese Dissertation waren tierexperimentelle Arbeiten notwendig, die mit Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo, Genehmigungsnummer T0189/02) durchgeführt wurden. Verwendet wurden Tiere der Rattenstämme Munich Wistar Frömter und Spontaneous Hypertensive Rat aus arbeitsgruppeneigener Zucht und Haltung. Die Etablierung und Haltung der Stämme fand in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM, Charité - Universitätsmedizin Berlin, CBF) statt. Die Tiere wurden mittels standardisierter Ohrlochmarkierungen in fortlaufender Nummerierung gekennzeichnet.

Die Haltung erfolgte nach Geschlechtern getrennt in Typ IV Makrolonkäfigen. Die Tiere wurden mit speziellem Haltungsfutter für Ratten und Wasser ernährt, zu denen sie jederzeit freien Zugang hatten. Wie üblich wurde ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus mittels einer automatisierten Lichtanlage generiert. Die Raumtemperatur betrug 22°C. Die Aufrechterhaltung dieser standardisierten äußeren Einflüsse wurde überwacht und war zu jeder Zeit gewährleistet.

2.2.2 Zucht von MWF und SHR

Die verwendeten männlichen Ratten stammen aus den ingezüchteten Rattenstämmen MWF/*Rkb* und SHR/*Rkb* (laboratory code *Rkb*, <http://dels.nas.edu/ilar/>) der FEM der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Durch ausschließliche Bruder-Schwester-Verpaarung ist eine genetische Homogenität zu mehr als 99 % gegeben (Ganten et al., 1994). Die ursprüngliche Kolonie von SHR/Mol-Ratten stammt von der Firma M&B, Bomholtvej, Dänemark und wird seit 1997 als eigene Kolonie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Kreutz, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité ingezüchtet. MWF-Ratten wurden 1996 von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold Kreutz aus dem MWF/Ztm-Stamm des Zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover übernommen und ebenfalls als eigene Kolonie weitergeführt.

2.3 Präparation und Isolierung der Glomeruli

Die Organentnahmen und Präparationen erfolgten nach 8 Wochen beziehungsweise 24 Wochen Aufzucht der männlichen Tiere. Zunächst wurde die Narkose über die peritoneale Injektion von S-(+)-Ketamin und Xylazin gewichtsadaptiert mit 87 mg/kg KG und 13 mg/kg KG eingeleitet. Nach Überprüfung einer ausreichenden Narkosetiefe und Rückenlagerung wurde mittels Medianschnitt das Abdomen der Tiere eröffnet. Beide Nieren wurden entnommen, entkapselt und mit einem Skalpell halbiert. Kelch und Mark der Nieren wurden entfernt und die Rinde wurde über einem Sieb mit 125 µm großen Poren mit 1xPBS-Lösung gespült. Durch Pressen des Filtrates durch ein Sieb mit 71 µm großen Poren wurden die Glomeruli isoliert und in Falconröhrchen gesammelt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 4°C mit 5000 U/min für zwei Minuten. Die Flüssigkeit wurde verworfen und das aus beiden Nieren gewonnene Pellet in 2,0 ml Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert. Die Lagerung erfolgte unter durchgehender Temperaturkontrolle bei -80°C. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte in lichtmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden, dass diese Form der Aufarbeitung der Glomeruli nur zu einer minimalen Verunreinigung durch tubuläre Kontaminationen führt.

2.4 Extraktion der microRNA aus den Glomeruli

Zur Gewinnung der microRNA wurden zunächst die im mirVana™ miRNA Isolation Kit enthaltenen Waschlösungen vorbereitet. 21 ml 100 % Ethanol wurden zur miRNA Wash Solution 1 und 40 ml 100 % Ethanol zur Wash Solution 2/3 gegeben und gemischt.

Der nächste Schritt beinhaltete den Gewebeaufschluss. Hierzu wurde 1 ml des Lysis/Binding Puffers in ein Greiner-Röhrchen überführt und das gefrorene Glomerulipellet in den Puffer gegeben. Die Durchmischung erfolgte mit Hilfe einer sterilen 2 ml Spritze und Kanüle durch zehnmaliges durchziehen. Das erhaltene Lysat wurde anschließend in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Zum Lysat wurden 100 µl miRNA Homogenat Additive ergänzt und das Gemisch wurde gevortext. Es folgte eine Inkubationszeit auf Eis von zehn Minuten. Vor der anschließenden Zentrifugation wurde 1 ml Acid-Phenol:Chloroform hinzugegeben und die Mischung wurde erneut für

mindestens 60 Sekunden gevortext. Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 10.000 U/min.

Zur erhaltenen wässrigen Phase wurden 333 µl 100 % Ethanol pipettiert und anschließend erneut gevortext. Zur Anreicherung der microRNA wurden etablierte Glasfaser-Filtersäulen verwendet. Dazu wurden von dem Gemisch aus Lysat und Ethanol 700 µl auf die vorbereitete Filterkartusche gegeben. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 U/min bei Raumtemperatur. Das erhaltene Filtrat wurde in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde mit dem restlichen Lysat-Ethanol-Gemisch auf die gleiche Weise verfahren und das gewonnene Filtrat wurde dem ersten hinzugefügt. Nach Hinzugabe von 800 µl 100 % Ethanol und anschließendem Vortexen wurde ein Gesamtvolumen von 2 ml erreicht. Hiervon wurden 700 µl auf eine neue Filterkartusche gegeben. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 U/min bei Raumtemperatur. Vor Wiederholung dieser Arbeitsschritte mit dem restlichen Filtrat wurde der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 700 µl der zuvor vorbereiteten miRNA Wash Solution 1 der Filterkartusche hinzugefügt und für zehn Sekunden bei 10.000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Von der vorbereiteten miRNA Wash Solution 2/3 wurden 500 µl auf die Filterkartusche pipettiert und für weitere 10 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Die restliche Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation für eine Minute aus dem Filter entfernt. Dieser wurde anschließend in ein sauberes 2 ml Gefäß überführt. Die Elution der microRNA vom Filter erfolgte durch Zugabe von 100 µl, auf 95 °C vorgewärmtes RNase-freies Wasser und anschließender Zentrifugation für 20 bis 30 Sekunden bei 12.000 U/min.

Durch spektralphotometrische Messung wurde die Konzentration der RNA im erhaltenen Eluat ermittelt. Die Lichtabsorption wurde bei 260 nm (A260) und bei 280 nm (A280) gemessen. Die Ergebnisse von A260 und A280 wurde in silico zueinander ins Verhältnis gesetzt und konnten so die Reinheit der erhaltenen RNA anzeigen. Zuletzt wurde das Eluat mit nukleasefreiem Wasser versetzt um eine Konzentration von 1 ng/µl zu erhalten.

2.5 Microarray-Profilung

Das microRNA-Profilung wurde durch das Unternehmen Miltenyi Biotec GmbH durchgeführt. Zur Analyse der microRNA wurden dafür miRXplore™ Microarray Kits eingesetzt. Für das Microarray-Profilung wurden insgesamt 16 RNA-Proben von Glomeruli-Isolaten männlicher Ratten verwendet. Dabei stammten 8 von MWF-Ratten und 8 von SHR-Ratten. Diese unterteilen sich zu gleichen Teilen in Präparate von 8 und 24 Wochen alten Tieren.

Um ein verlässliches Expressionsmuster zu gewährleisten wurden in der Analyse nur microRNA berücksichtigt, die eine Signalintensität über dem Hintergrund in mindestens einer der Proben aufwiesen. Um dabei Hybridisierungsartefakte, welche zum Beispiel durch die microRNA-Sequenz oder unterschiedliche Schmelztemperaturen der microRNA entstanden sein könnten, zu minimieren, wurden alle Proben mit einem artifiziellen Set einer universellen Referenz kohybridisiert, auf die abgeglichen wird. Hierdurch ist eine gute Vergleichbarkeit der Proben der unterschiedlichen Stämme gewährleistet. Die universelle Referenz enthielt 980 synthetische Einzelstrang-RNA-Oligonukleotide bekannter microRNA in äquimolarer Konzentration. Die Sequenzen der Mensch-, Maus-, Ratten- und der viralen microRNA in der Referenz wurden von Miltenyi Biotec GmbH aus der mirBase Version 9.2 entnommen (<http://microrna.sanger.ac.uk>).

Als Maß für die differentielle Expression einer microRNA wird der sogenannte Fold Change verwendet. Zur Berechnung des Fold Changes in der vorliegenden Arbeit wurden die Signalintensitäten der Proben zur kohybridisierten universellen Referenz und zueinander ins Verhältnis gesetzt und über die in Abb. 4 aufgeführte Formel die sogenannte Re-Ratio gebildet.

$$\frac{\frac{Probe}{UR}}{\frac{Kontrolle}{UR}} = \frac{Probe}{Kontrolle} (Re - Ratio)$$

Abbildung 4: **Prinzip der Re-Ratio-Berechnung zur Ermittlung des Fold Changes für die Microarray-Analyse von microRNA.** Hierdurch ist ein indirekter Vergleich von Probenmaterial und Kontrolle durch den Einsatz einer Universal Reference möglich. UR, Universal Reference

Zur Berechnung der einzelnen Ratio wurde zunächst das Verhältnis der Signalintensität der microRNA einer Probe zum Signal der kohybridisierten universellen Referenz bestimmt. Anschließend wurden die Re-Ratios aus einem MWF-Ratio und einem SHR-Ratio gebildet. Es folgte die Bestimmung der Mittelwerte der Re-Ratios, welche den sogenannten Fold Change widerspiegeln.

Als Maß für einen signifikanten Unterschied in der Expression einer microRNA zwischen zwei Gruppen ist entsprechend der Angaben des Unternehmens Miltenyi ein Fold Change von >2 oder $<0,5$ anzusehen.

2.6 cDNA Synthese

Zur Durchführung einer RT-qPCR musste die extrahierte RNA in cDNA durch eine reverse Transkriptase-Reaktion umgewandelt werden.

Es wurde zunächst ein Reverse Transcription Mastermix (RT-Mastermix) aus 0,15 μ l dNTP mix (100 mM total), 1 μ l Multiscribe™ RT enzyme (50 U/ μ l), 1,5 μ l 10x RT Puffer, 0,19 μ l RNase Inhibitor (20 U/ μ l) und 4,16 μ l nukleasefreies Wasser erstellt. Nach dem Pipettieren der einzelnen Lösungen wurden diese gemischt und herunterzentrifugiert. Zur späteren Verwendung wurden die 7 μ l RT-Mastermix auf Eis gekühlt.

Zur Durchführung der reversen Transkription wurden 7 μ l RT-Mastermix mit 5 μ l RNA und 3 μ l 5x RT Primer in ein 0,2 ml PCR-Gefäß pipettiert und gemischt. Es folgte eine fünf minütige Inkubationszeit auf Eis. Die reverse Transkription erfolgte anschließend im Thermocycler über 30 Minuten bei 16 °C, 30 Minuten bei 42 °C und 5 Minuten bei 85 °C.

2.7 RT-qPCR-Assays

Zur Konfirmierung der im Profiling ermittelten microRNA wurde eine RT-qPCR-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die durch die reverse Transkription erhaltene cDNA und der 20x Primer des Taqman® MicroRNA Assays durch Vortexen und Zentrifugation vorbereitet. Zur Herstellung eines Mastermix wurden 12 μ l TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2x), no UNG (no uracil-N-glycosylase), 1,2 μ l des 20x

Primers vom Taqman® MicroRNA Assay und 9,2 µl nukleasefreiem Wasser gemischt. Anschließend wurden zu jeweils 4,8 µl cDNA 70,2 µl des Mastermix gegeben. Von den 75 µl wurden je 23 µl in drei Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert, mit einer MicroAmp™ Optical Adhesive Film-Folie verschlossen und für eine Minute bei 2500 U/min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die RT-qPCR im PCR-Cycler mit einem Zyklus für zwei Minuten bei 50 °C, einem Zyklus für zehn Minuten bei 95 °C, 40 Zyklen für 15 Sekunden bei 95 °C und einem weiteren Zyklus für eine Minute bei 60 °C. Die Auswertung erfolgte anschließend über das ABI Prism 7000 Sequence Detection System. Als Kontrollgruppe diente SHR der 8. Woche. Als Referenz-microRNA für die Untersuchungen diente die microRNA miR-16, für die in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass sie in den Glomeruli vom MWF- und SHR-Stamm die Eigenschaften eines Referenzgen erfüllt (Dissertation Viktor Kebede, 2016). Es wurden jeweils Glomeruli-Isolate von 10 Tieren entsprechenden Alters untersucht.

2.8 Kartierung und Target Prediction Tools

Die Kartierungen der identifizierten microRNA wurden über RGSC v6.0 vorgenommen (Rat Genome Database Website, <http://rgd.mcw.edu/>). Zur Identifizierung möglicher Targetgene wurde die Datenbank miRGate (<http://mirgate.bioinfo.cnio.es>) herangezogen. Die Datenbank vergleicht die unterschiedlichen Vorhersagemethoden von acht unterschiedlichen Datenbanken (Miranda, Rnahybrid, Pita, Microtar, Targetscan, Mirtabase, Mirecords und Tarbase) hinsichtlich möglicher microRNA-mRNA-Paarungen (Andrés-León et al., 2015). Bei mehreren Übereinstimmungen in unterschiedlichen Target Prediction Tools ist eine Regulierung der mRNA durch eine identifizierte microRNA mit höherer Wahrscheinlichkeit zutreffend (Andrés-León et al., 2015). Für diese Dissertation wurden die Gene aus dem QTL auf RNO6 mit der microRNA-ID der bestätigten microRNA überprüft, wobei hierbei die in Tabelle 1 aufgeführten Einstellungen vorgenommen wurden.

Tabelle 1: Einstellungen zur Anfrage in der miRGate-Datenbank.

Abfrage	Einstellung
Organismus	Rattus norvegicus
Listenart	Gene und microRNA
Identifikator	Gen-Symbol und miRNA-ID
Erweiterte Optionen	Nutzung aller implementierten Datenbanken und Biotypes; Nutzung nur bekannter UT-Regionen; Nutzung nur von Hauptisoformen von Transkripten

2.9 Statistische Auswertungen

Die Auswertung der RT-qPCR erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms PASW Statistics 27 von SPSS. Die statistische Auswertung erfolgte bei bestehender Normalverteilung mit einem Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben mit ungleichen Varianzen (Welch-Test). Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen, was einem Signifikanzniveau von 95% entspricht. Die Ermittlung des Standardfehlers erfolgte als Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Alle Daten sind als Mittelwert (MW) \pm SEM angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Microarray-Profilig-Analysen der microRNA

Mittels der Microarray-Untersuchung zur Identifizierung glomerulärer microRNA zeigten sich zwischen MWF und SHR der 8. Woche insgesamt sechs microRNA miR-150, miR-195, miR-347, miR-351, miR-451, miR-497 mit einem Fold Change >2. Zusätzlich wurde miR-145, die näherungsweise einen Fold Change von 2 erreichte und eine sehr geringe Standardabweichung aufwies, für eine weitere Untersuchung vorgemerkt (Tab. 2). Drei weitere microRNA miR-192, miR-194, miR200a in der Gruppe der 8 Wochen alten Tiere zeigten näherungsweise einen Fold Change von 0,5 zusammen mit einer geringen Standardabweichung und wurden für eine weitere Analyse mitausgewählt. In der Gruppe der 24 Wochen alten Ratten konnte kein Unterschied im Fold Change über zwei oder unter 0,5 für microRNA nachgewiesen werden. Die microRNA miR-151-5p, miR-130a, miR146a, die näherungsweise einen Fold Change von 0,5 aufwiesen und zusätzlich eine geringe Standardabweichung boten, wurden ebenfalls zur weiteren Untersuchung miteinbezogen (Tab. 3).

Tabelle 2: Vergleich zwischen MWF und SHR der 8. Woche im Microarray.

miRNA	Gene Accession	Fold Change	Standardabweichung
miR-145	MI0000918	1,964	0,330
miR-150	MI0000920	3,115	1,225
miR-192	MI0000935	0,530	0,153
miR-194-2 miR-194-1	MI0000937 MI0000938	0,517	0,027
miR-195	MI0000939	2,477	1,182
miR-200a	MI0000943	0,642	0,057
miR-347	MI0000635	2,879	0,784
miR-351	MI0000642	2,590	0,837
miR-451	MI0001731	2,586	1,218
miR-497	MI0003724	2,859	1,446

Tabelle 3: Vergleich zwischen MWF24. Woche und SHR 24. Woche im Microarray.

miRNA	Gene Accession	Fold Change	Standardabweichung
miR-130a	MI0000903	0,677	0,144
miR-146a	MI0000919	0,648	0,101
miR-151-5p	MI0000647	0,686	0,043

3.2 Konfirmierung der microRNA durch RT-qPCR

Die mittels Microarray-Profilings ermittelten insgesamt 13 microRNA mit einer vermehrten beziehungsweise verminderten Expression zwischen dem MWF-Stamm und dem SHR-Stamm wurden durch RT-qPCR-Assays überprüft. Für fünf microRNA (miR-150, miR-497, miR-351, miR-195, miR-145) konnte ein signifikant erhöhter Expressionsunterschied zwischen dem nierengesunden SHR-Stamm und der MWF-Ratte im Alter von 8 Wochen konfirmiert werden. Zwei der untersuchten microRNA mit einem erhöhten Fold Change (miR-347, miR-451) konnten nicht konfirmiert werden. Die drei zu konfirmierenden microRNA (miR-200A, miR-192, miR-194) mit einem erniedrigten Fold Change im Alter von 8 Wochen zeigten alle ein signifikant erniedrigtes Expressionslevel. Im Alter von 24 Wochen waren drei microRNA (miR-130A, miR-151-5P, miR-146A) zu konfirmieren, da sie einen erniedrigten Fold Change aufwiesen. Von diesen dreien wies nur miR-130A ein entsprechend erniedrigtes Expressionslevel auf.

3.2.1 microRNA mit erhöhtem Fold Change im Alter von 8 Wochen

MicroRNA miR-150 wies im Microarray-Profilung einen Fold Change von $3,12 \pm 1,23$ bei der 8 Wochen alten MWF-Ratte und damit eine gesteigerte Expression der microRNA im Vergleich zur gleichalten SHR-Ratte auf. In der Konfirmierung zeigte sich für den MWF-Stamm ein signifikanter Unterschied von $173\% \pm 35\%$ im Vergleich zum SHR-Stamm mit $100\% \pm 11\%$ ($t(10,61) = -6,29, p < 0,001$; Abb. 5).

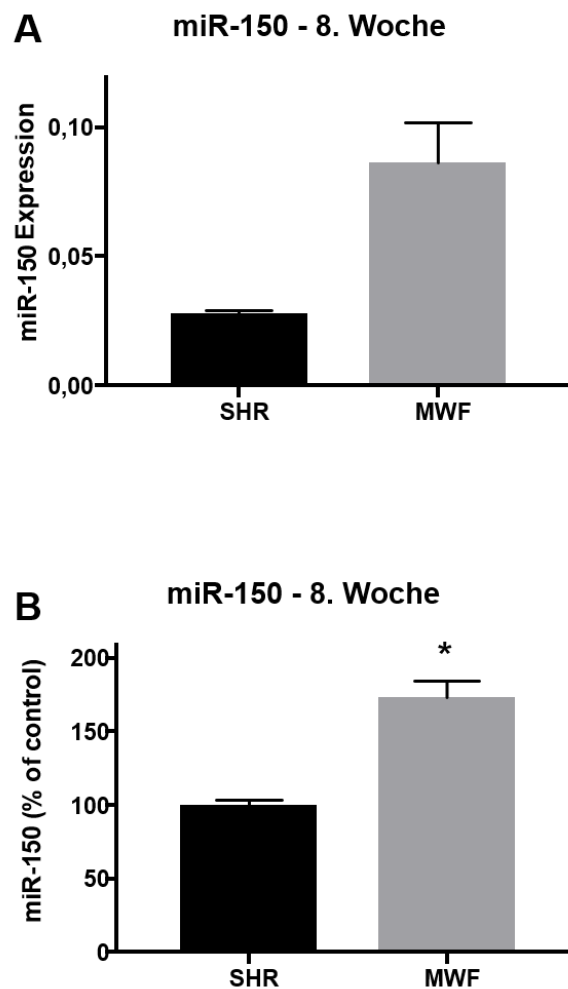


Abbildung 5: **Identifizierung der microRNA miR-150** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4$ /Stamm, Fold Change = $3,12$; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 10$, * $p < 0,001$.

Für die microRNA miR-347 wurde der Fold Change mit $2,88 \pm 0,78$ für den 8 Wochen alten MWF-Stamm ermittelt. In der Konfirmierung bestand hier allerdings kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum gleichalten SHR-Stamm. Für den MWF-Stamm ergab sich lediglich ein tendenzieller prozentualer Anstieg auf $110\% \pm 33\%$ im Vergleich zum SHR-Stamm mit $100\% \pm 30\%$ ($t(17,83) = 0,72$, $p = 0,478$, Abb. 6).

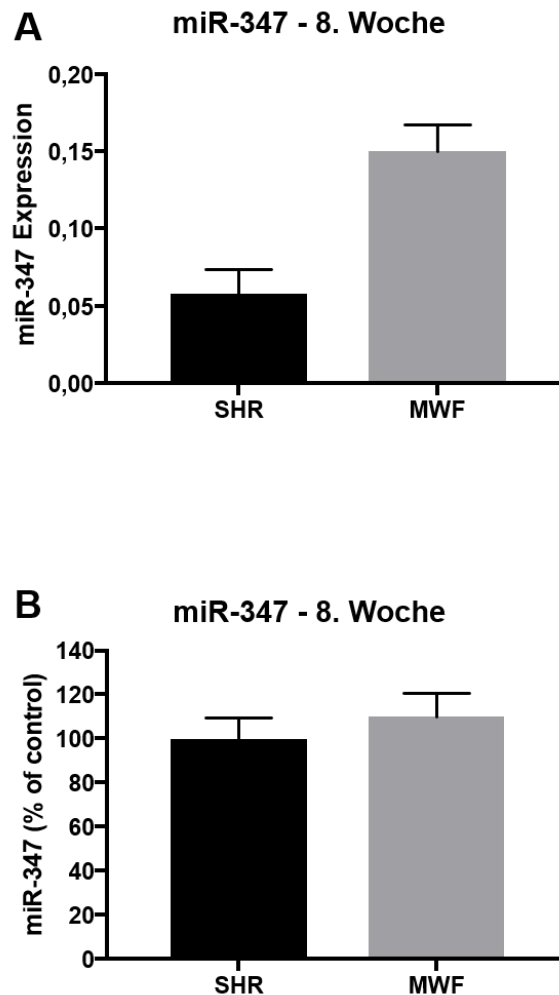


Abbildung 6: Identifizierung der microRNA miR-347 in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4/\text{Stamm}$, Fold Change = 2,88; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 10$, $p = 0,478$.

Der Fold Change für microRNA miR-497 lag im Microarray-Profilung bei $2,86 \pm 1,45$. Die Konfirmierung bestätigte hier die erhöhte Expression bei der 8 Wochen alten MWF-Ratte mit einem signifikanten Anstieg auf $179\% \pm 28\%$ im Vergleich zum SHR-Stamm ($100\% \pm 9\%$; $t(10,85) = -8,37$; $p < 0,001$; Abb. 7).

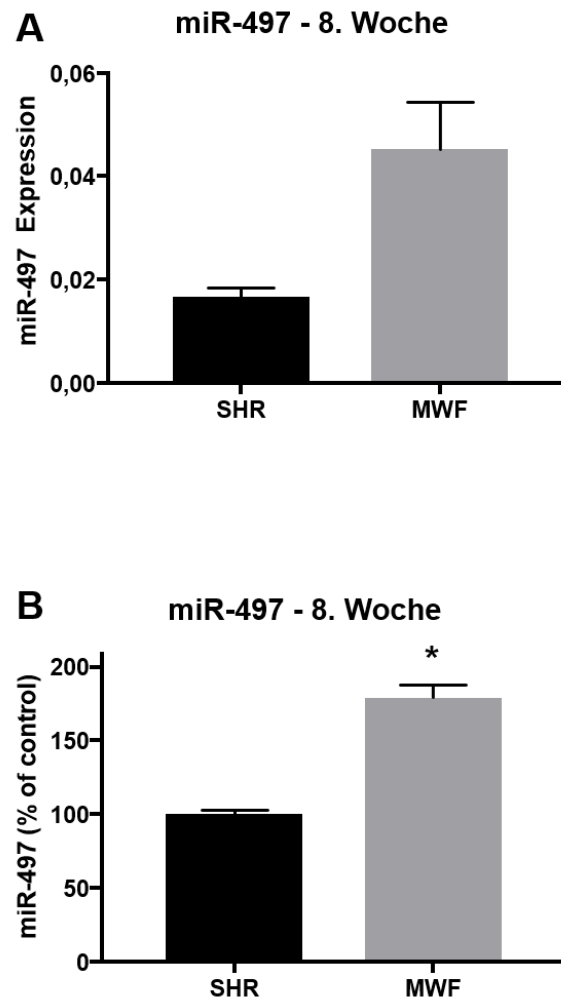


Abbildung 7: **Identifizierung der microRNA miR-497** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4/\text{Stamm}$, Fold Change = 2,866; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 10$, * $p < 0,0001$.

Für die im Microarray-Profilung mit einem Fold Change von $2,59 \pm 0,84$ ermittelte microRNA miR-351 konnte in der Konfirmierung mittels RT-qPCR ein signifikanter Anstieg der Expression auf $241\% \pm 28\%$ für den MWF-Stamm im Vergleich zum SHR-Stamm mit $100\% \pm 15\%$ in der 8. Woche festgestellt werden (Abb. 8, $t(11,92) = -13,43$; $p < 0,001$).

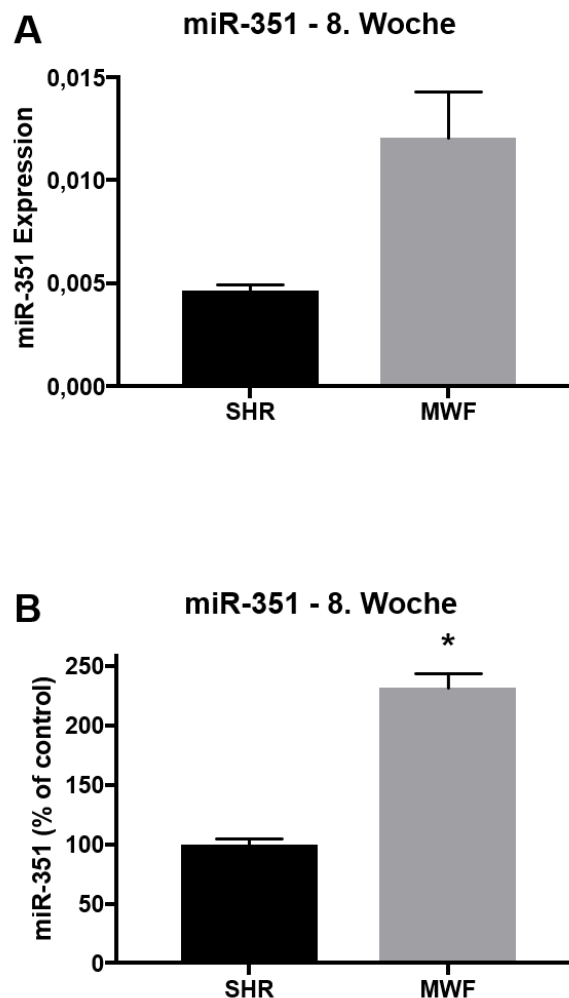


Abbildung 8: **Identifizierung der microRNA miR-351** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4/\text{Stamm}$, Fold Change = 2,59; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 9$, * $p < 0,0001$.

Das Microarray-Profilung zeigte für microRNA miR-451 bei der MWF-Ratte einen Fold Change von $2,59 \pm 1,22$ im Vergleich zur SHR-Ratte im Alter von 8 Wochen. In der zur Konfirmierung durchgeführten RT-qPCR konnte keine signifikante Änderung der Expression quantifiziert werden (MWF $88\% \pm 34\%$ vs. SHR $100\% \pm 17\%$, Abb. 9, $t(11,92) = 0,95$; $p = 0,36$).

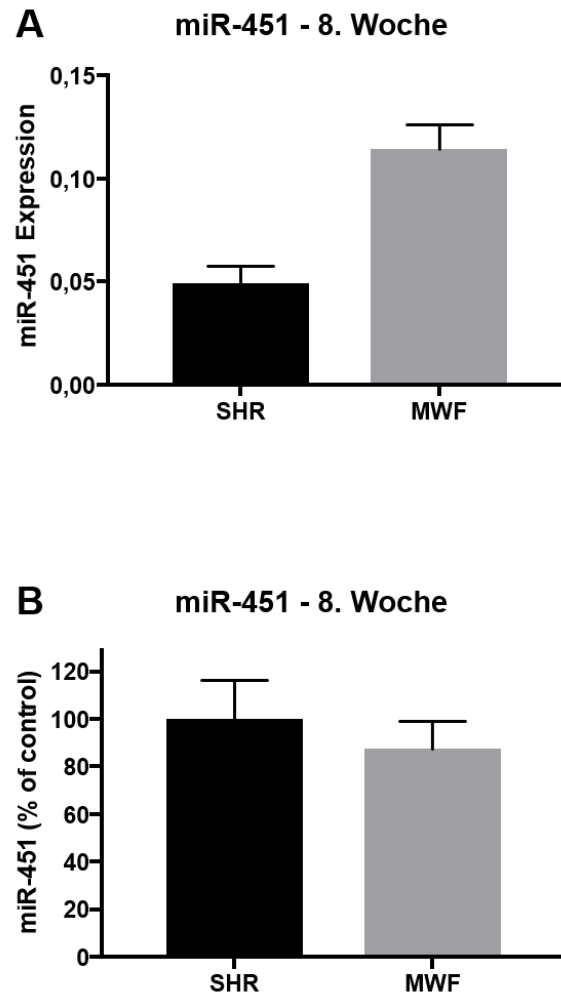


Abbildung 9: **Identifizierung der microRNA miR-451** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4/\text{Stamm}$, Fold Change = 2,59; B, SHR $n = 8$, MWF $n = 9$, $p = 0,36$.

Für die microRNA miR-195 war für die 8 Wochen alte MWF-Ratte im Vergleich zur 8 Wochen alten SHR-Ratte im Microarray-Profilung ein Fold Change von $2,45 \pm 1,18$ ermittelt worden. Die zur Konfirmierung durchgeführte RT-qPCR bestätigte einen signifikanten Anstieg von $100\% \pm 18\%$ für die nierengesunde SHR-Ratte der auf $141\% \pm 24\%$ für die MWF-Ratte der 8. Woche ($t(16,79) = -4,4$; $p < 0,001$, Abb. 10).

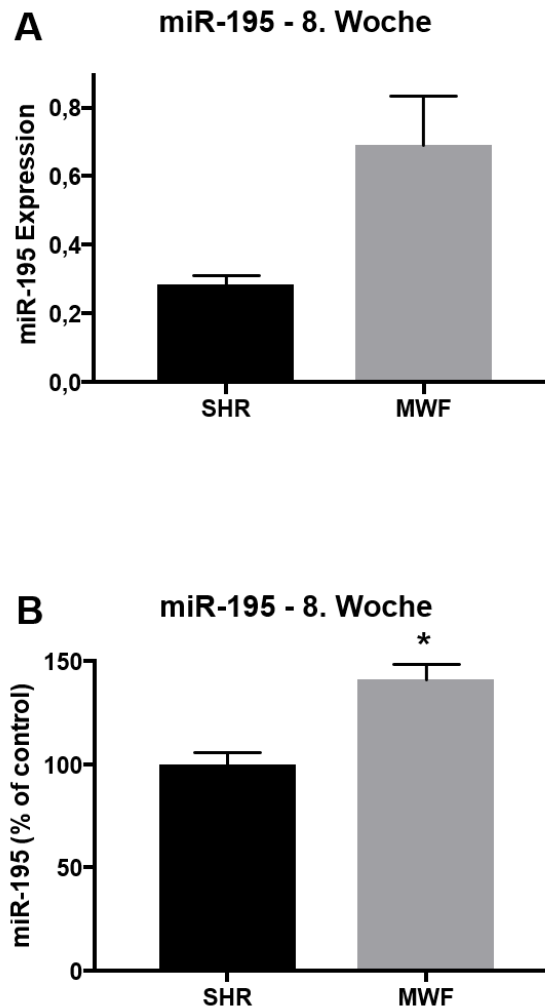


Abbildung 10: **Identifizierung der microRNA miR-195** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4$ /Stamm, Fold Change = 2,45; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 10$, * $p < 0,001$.

Die letzte microRNA, miR-145, mit einem erhöhten Fold Change bei der 8 Wochen alten MWF-Ratte zeigte nur näherungsweise den empfohlenen Fold Change von >2 , wurde aber bei einer vergleichsweise sehr geringen Standardabweichung trotzdem zur Konfirmierung ausgewählt (FC = $1,96 \pm 0,33$). In der RT-qPCR konnte eine signifikante prozentuale Expressionssteigerung von $100\% \pm 12\%$ für den SHR-Stamm auf $169\% \pm 19\%$ für den MWF-Stamm der 8. Woche ermittelt werden ($t(15,18) = -9,86$; $p < 0,001$; Abb. 11).

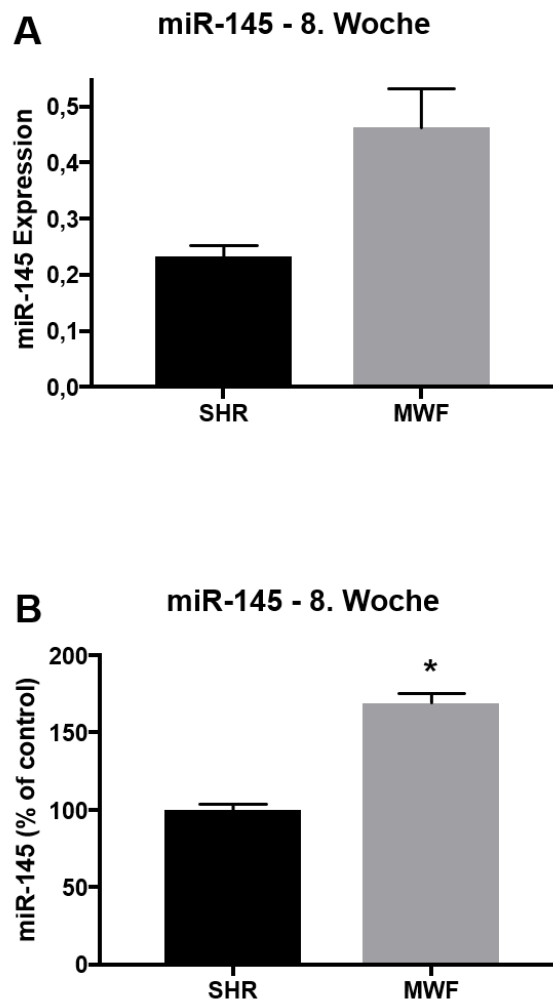


Abbildung 11: **Identifizierung der microRNA miR-145** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4$ /Stamm, Fold Change = $1,96$; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 10$, * $p < 0,001$.

3.2.2 microRNA mit einem erniedrigten Fold Change im Alter von 8 Wochen

Im Microarray-Profilung konnte für die microRNA miR-200a ein Fold Change von $0,64 \pm 0,06$ nachgewiesen werden. In der Konfirmierungsuntersuchung zeigte sich für diese microRNA eine signifikant verminderte Expression von $76\% \pm 13\%$ bei der 8 Wochen alten MWF-Ratte im Vergleich zur gleichalten SHR-Ratte ($100\% \pm 16\%$, $t(17,18) = 3,72$; $p < 0,002$; Abb. 12).

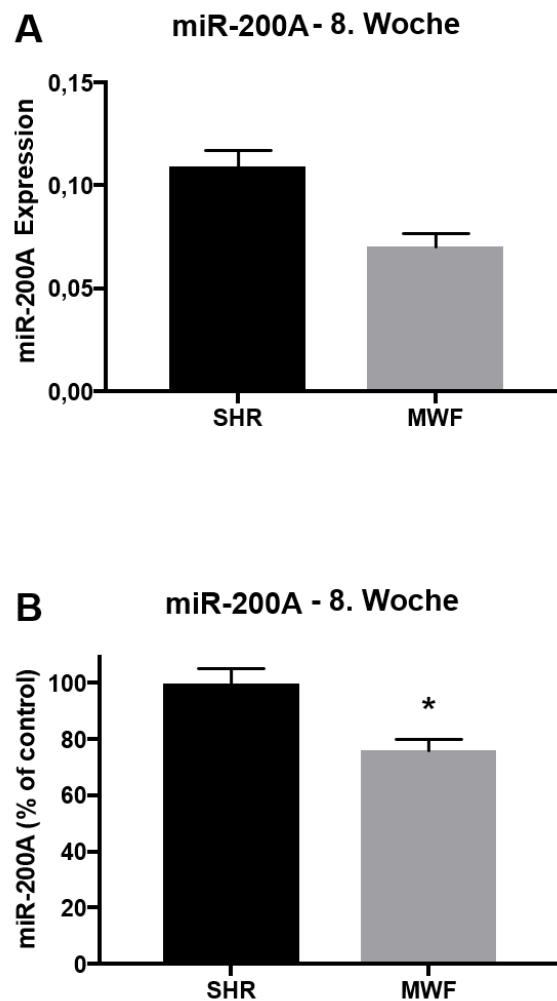


Abbildung 12: **Identifizierung der microRNA miR-200A** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4/\text{Stamm}$, Fold Change = $0,64$; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 10$, * $p < 0,002$.

Für die microRNA miR-192 wurde im Microarray-Profilung ein Fold Change von $0,53 \pm 0,15$ im MWF-Stamm der 8. Woche im Vergleich zum 8 Wochen alten SHR-Stamm ermittelt. In der RT-qPCR stellte sich eine signifikant verminderte Expression beim MWF-Stamm ($54\% \pm 12\%$) im Vergleich zum SHR-Stamm ($100\% \pm 13\%$, $t(17,98) = 8,15$; $p < 0,001$, Abb. 13) dar.

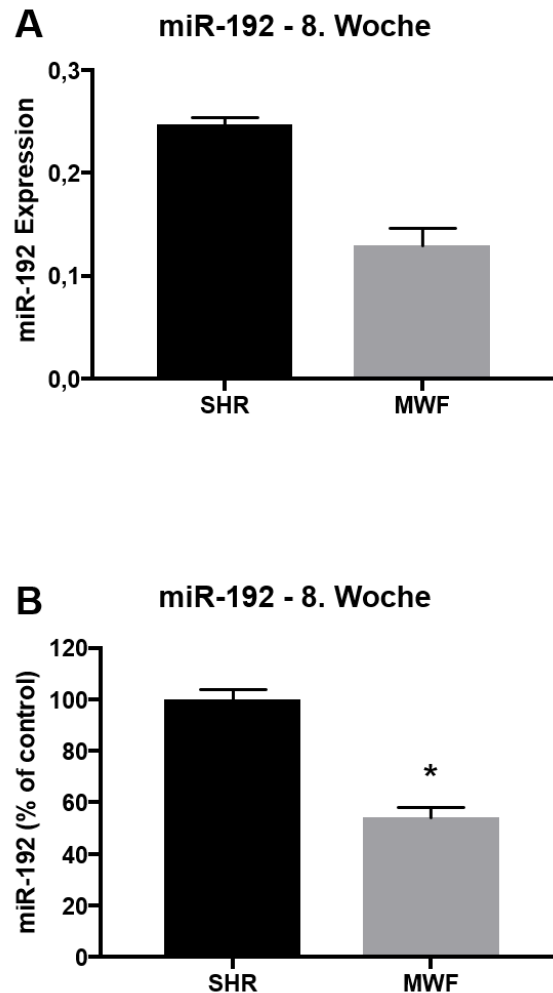


Abbildung 13: **Identifizierung der microRNA miR-192** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4/\text{Stamm}$, Fold Change = $0,53$; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 10$, * $p < 0,001$.

Die letzte im Vergleich der 8 Wochen alten Ratten vom MWF- und SHR-Stamm untersuchte microRNA, miR-194, zeigte im Microarray-Profilung einen Fold Change von $0,52 \pm 0,03$. In der RT-qPCR konnte eine verminderte Expression der microRNA in den 8 Wochen alten MWF-Ratten ($72\% \pm 11\%$) im Vergleich zu den SHR-Ratten ($100\% \pm 17\%$) konfirmiert werden ($t(15,64) = 4,34$; $p < 0,001$, Abb. 14).

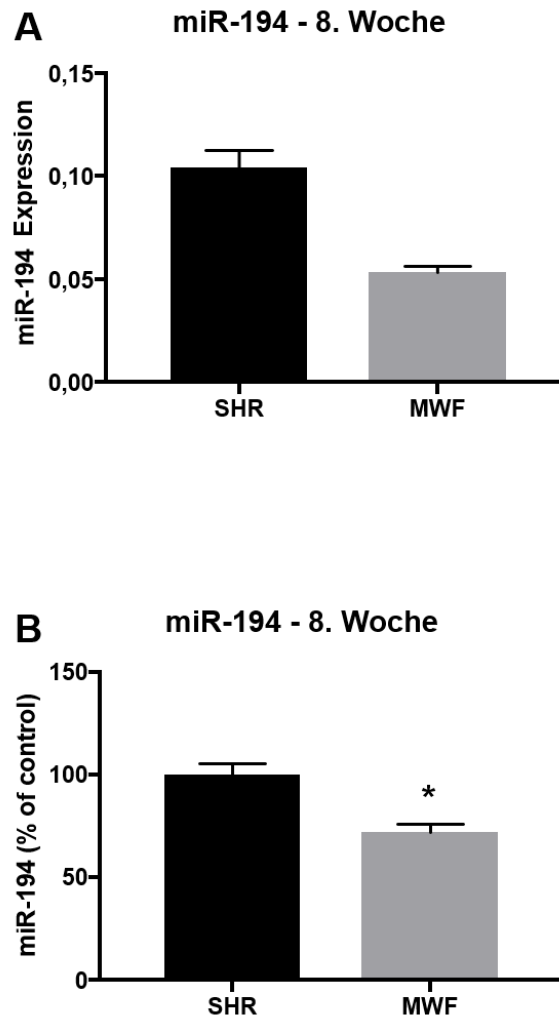


Abbildung 14: **Identifizierung der microRNA miR-194** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4/\text{Stamm}$, Fold Change = $0,52$; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 8$, * $p < 0,001$.

3.2.3 microRNA in der 24 Wochen alten Gruppe

Das Microarray-Profilung ermittelte für die 24 Wochen alten MWF-Ratte einen Fold Change von $0,68 \pm 0,14$ für die microRNA miR-130a. In der Konfirmierung mittels RT-qPCR bestand im Vergleich zur gleichalten SHR-Ratte eine signifikant verminderte Expression ($80\% \pm 8\%$ für MWF; $100\% \pm 8$ für SHR, $t(16,64) = 5,49$; $p < 0,001$; Abb. 15).

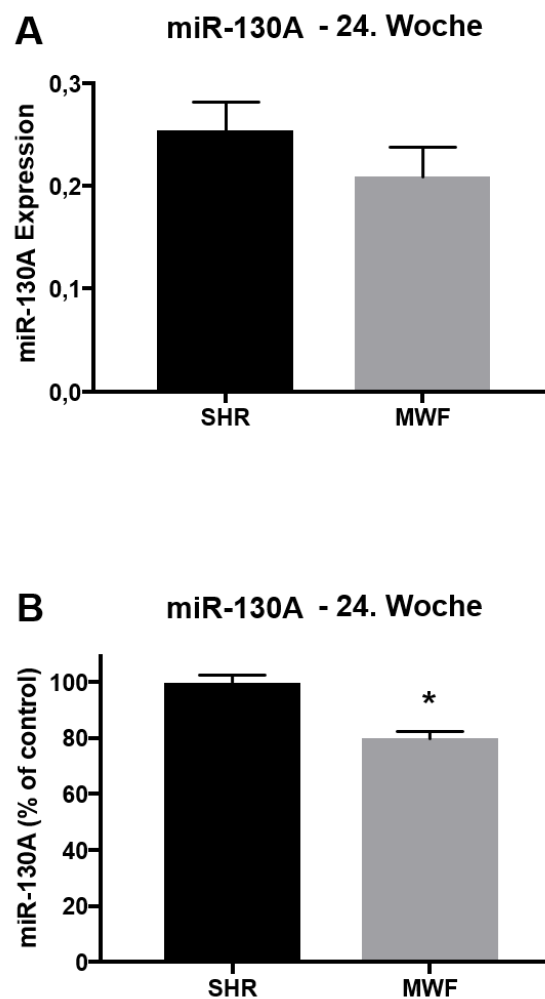


Abbildung 15: **Identifizierung der microRNA miR-130A** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 8 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4/\text{Stamm}$, Fold Change = $0,68$; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 10$, * $p = 0,001$.

Für die micro-RNA miR-151 konnte im Microarray-Profilung ein Fold Change von $0,69 \pm 0,04$ ermittelt werden. In der Konfirmierung mittels RT-qPCR war die Expression der microRNA im 24 Wochen alten MWF-Stamm ($108\% \pm 9\%$) im Vergleich zum gleichalten SHR-Stamm ($100\% \pm 28\%$) nicht signifikant vermindert ($t(9,32) = -0,87$; $p = 0,407$; Abb. 16).

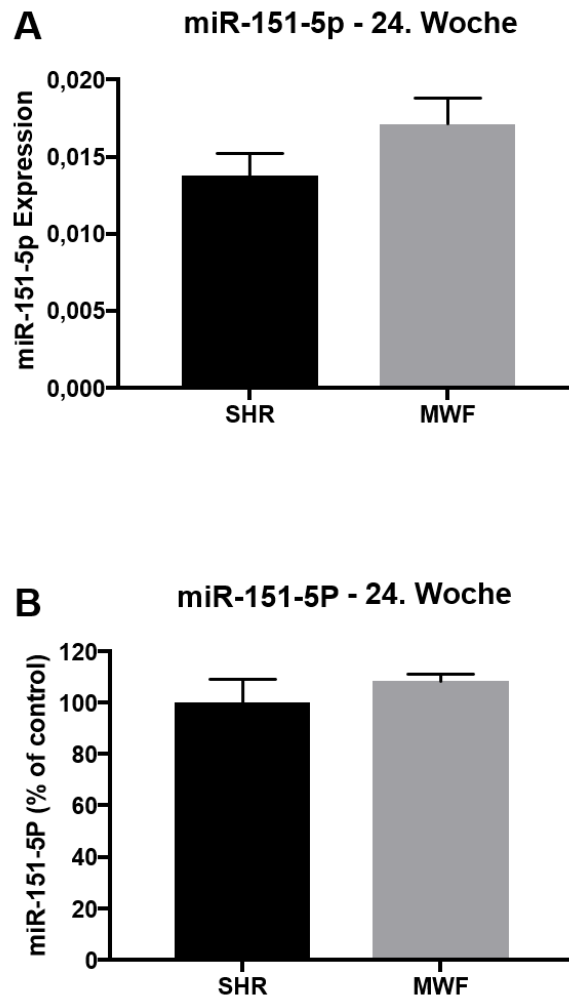


Abbildung 16: **Identifizierung der microRNA miR-151-5p** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 24 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4$ /Stamm, Fold Change = $0,69$; B, SHR $n = 8$, MWF $n = 10$, $p = 0,407$.

Die letzte microRNA miR-146a zeigte im Microarray-Profilung einen Fold Change von $0,65 \pm 0,10$. Die durch die RT-qPCR durchgeführte Konfirmierung konnte allerdings keine signifikante Änderung der Expression bei den 24 Wochen alten MWF-Ratten ($95\% \pm 12\%$) im Vergleich zum gleichalten SHR-Stamm ($100\% \pm 10\%$; Abb. 17) festgestellt werden ($t(16,98) = 0,94$; $p = 0,359$).

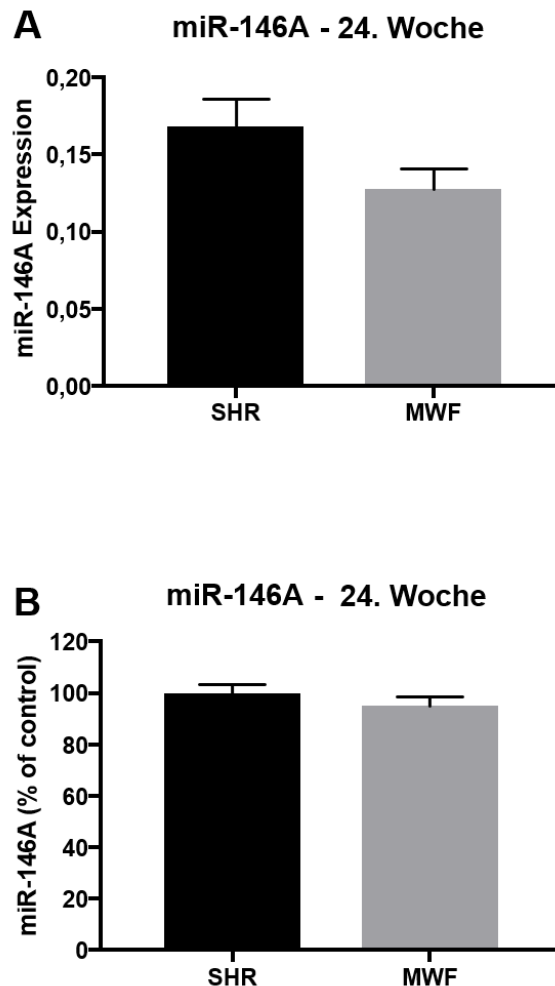


Abbildung 17: **Identifizierung der microRNA miR-146A** in (A) Microarray-Analyse mit Angabe des Expressionsunterschieds nach Berechnung der Re-Ratio und (B) Konfirmierung über RT-qPCR in Glomeruli-Präparaten vom MWF- und SHR-Stamm im Alter von 24 Wochen. Angaben als Mittelwerte mit SEM. A, $n = 4/\text{Stamm}$, Fold Change = $0,65$; B, SHR $n = 10$, MWF $n = 10$, $p = 0,359$.

3.3 Kartierungen der microRNAs in Albuminurie-QTL beim MWF-Rattenstamm

Anhand der Koordinaten der einzelnen microRNA wurden die Positionen auf den Chromosomen ermittelt (Tab. 4). Die Positionen der microRNA sind in Abb. 18 und 19 schematisch dargestellt. Es konnte demonstriert werden, dass die identifizierten microRNA in keinem der bekannten Albuminurie-QTL lokalisiert sind.

Vier der bestätigten microRNA, miR-150, miR-192, miR-194 und miR-351, sind auf Chromosomen lokalisiert auf denen auch Albuminurie-QTL kodieren. MiR-150, miR192 und miR-194 sind auf RNO1 und miR-351 ist auf RNOX lokalisiert (Abb.18). Die anderen sechs microRNA miR-130, miR-200a, miR-195, miR-497, miR-194-1, miR-145 kartieren auf Chromosomen, auf denen keine Albuminurie-QTL bei der MWF-Ratte zu identifizieren waren (Abb. 19).

Tabelle 4: Kartierung der bestätigten microRNA im Genom der MWF-Ratte.

Alter in Wochen	miRNA	Chromosom	Position
8	miR-150	1	101,115,974 - 101,116,058
8	miR-192	1	228,620,072 - 228,620,181
8	miR-194-1	1	228,619,887 - 228,619,971
24	miR-130a	3	78,661,697 - 78,661,784
8	miR-200a	5	176,963,388 - 176,963,476
8	miR-195	10	56,589,465 - 56,589,551
8	miR-497	10	56,844,977 - 56,845,045
8	miR-145	18	56,198,820 - 56,198,907
8	miR-351	X	152,774,513 - 152,774,593

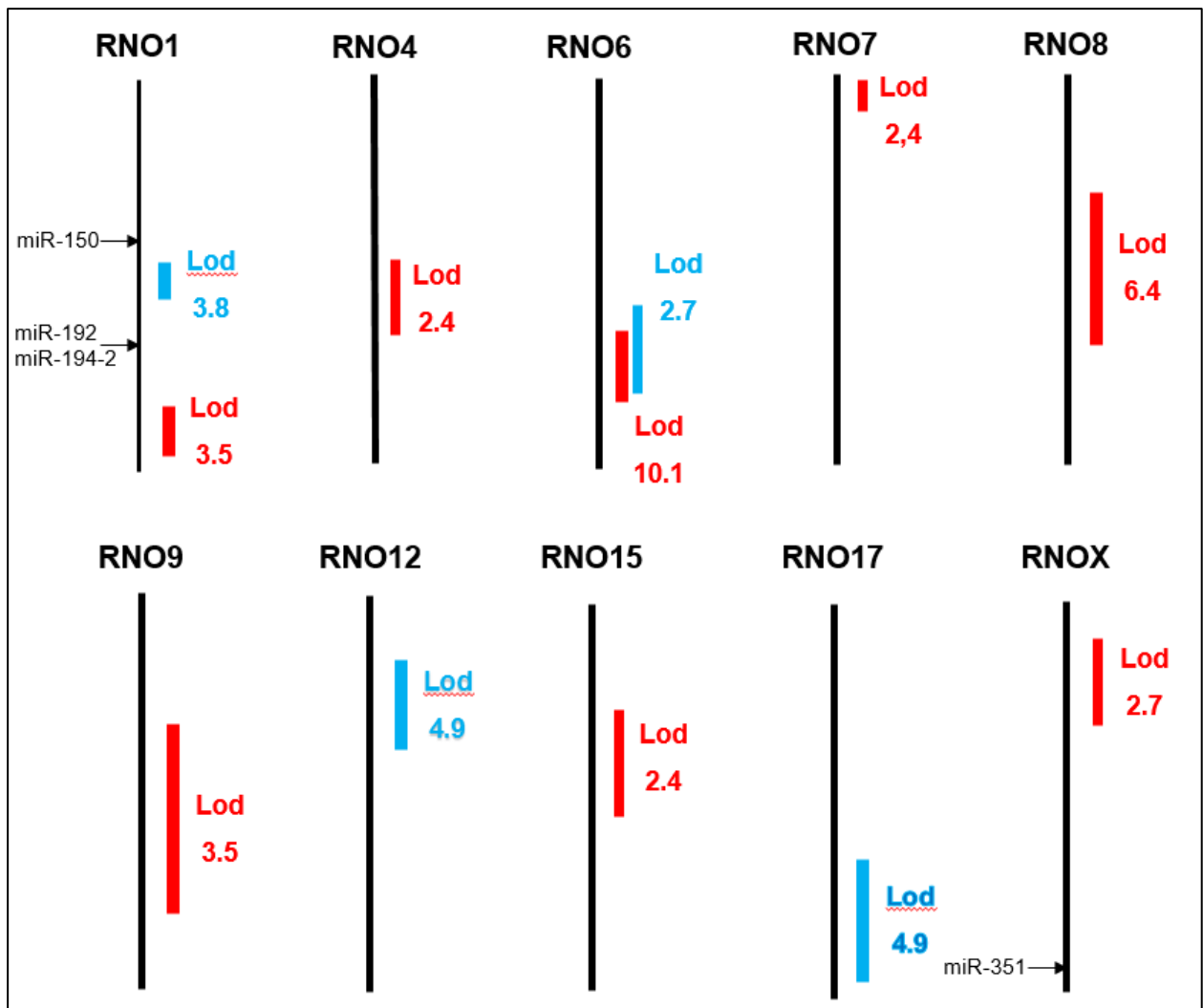


Abbildung 18: Lokalisierung confirmierter microRNA in Bezug auf bekannte Albuminurie-QTL bei der MWF-Ratte. RNO, Rattenchromosom; Lod, logarithm of the odds.

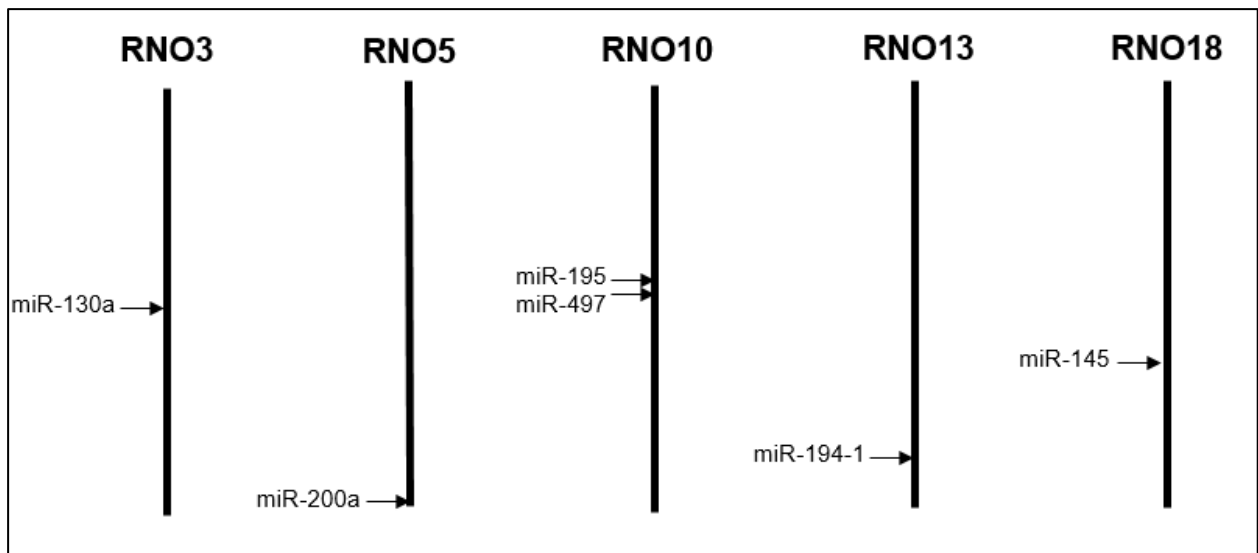


Abbildung 19: Lokalisierung der bestätigten microRNA auf Chromosomen ohne bekannte Albuminurie-QTL der MWF-Ratte. RNO, Rattenchromosom.

3.4 Target-Gene der differentiell exprimierten und bestätigten microRNA

Mittels Datenbankrecherche über mirGate wurden potentielle Target-mRNA für die zehn bestätigten microRNA identifiziert (Abb. oder Tab-Nachweis). Aufgrund der Eigenschaft von microRNA mehrere Target-Gene zu regulieren, wurden nur die Gene ausgewählt, die in die bekannten Albuminurie-QTL auf RNO6 kartieren. Hierbei konnten durch die in mirGate implementierte Algorithmik mit Zugriff auf verschiedene Datenbanken (Miranda, Rnahybrid, Pita, Microtar, Targetscan, Mirtarbase, Mirecords und Tarbase) im QTL auf RNO6 258 Sequenzen auf 51 Genen detektiert werden, die durch die zehn bestätigten microRNA reguliert werden könnten. Dabei wurden 43 Sequenzen auf 20 Genen zweimal und eine Sequenz viermal als potentielle Targets der bestätigten microRNA bei der Ratte erkannt (Tabelle 5; gezeigt werden nur die Gene mit 2 oder mehr Vorhersagen). Pita, Mirtarbase, Mirecords und Tarbase zeigten keine Vorhersagen einer microRNA-mRNA-Regulation.

Tabelle 5: Target-Gene im Albuminurie-QTL auf RNO6.

Gen-Symbol	MicroRNA-ID	Vorhersagen (Datenbanken)
Aldh6A1	rno-mir-195-5p	2 (Targetscan, Miranda)
Aldh6A1	rno-mir-497-3p	2 (Targetscan, Miranda)

Gen-Symbol	MicroRNA-ID	Vorhersagen/Datenbanken
Angel1	rno-mir-150-3p	2 (Microtar, Miranda)
Angel1	rno-mir-150-5p	2 (Miranda, Microtar)
Angel1	rno-mir-497-5p	2 (Microtar, Miranda)
Batf	rno-mir-130a-5p	4 (Microtar)
Batf	rno-mir-195-3p	2 (Miranda, Microtar)
Ccdc176	rno-mir-200a-3p	2 (Microtar, Miranda)
Elmsan1	rno-mir-194-3p	2 (Rnahybrid, Microtar)
Flvcr2	rno-mir-130a-3p	2 (Miranda, Targetscan)
Flvcr2	rno-mir-192-3p	2 (Targetscan, Miranda)
Flvcr2	rno-mir-194-5p	2 (Miranda, Targetscan)
Fos	rno-mir-192-3p	2 (Microtar)
Gstz1	rno-mir-130a-3p	2 (Miranda, Targetscan)
Gstz1	rno-mir-130a-5p	2 (Microtar, Miranda)
Gstz1	rno-mir-195-3p	2 (Microtar)
Gstz1	rno-mir-351-5p	2 (Microtar, Miranda)
Ltbp2	rno-mir-145-3p	2 (Microtar)
Nek9	rno-mir-130a-3p	2 (Miranda, Targetscan)
Ngb	rno-mir-145-3p	2 (Microtar)
Ngb	rno-mir-351-3p	2 (Microtar)
Npc2	rno-mir-145-5p	2 (Microtar, Miranda)
Npc2	rno-mir-195-5p	2 (Miranda, Microtar)
Npc2	rno-mir-497-5p	2 (Microtar, Miranda)
Pgf	rno-mir-130a-5p	2 (Miranda, Microtar)
Pgf	rno-mir-145-5p	2 (Miranda, Microtar)
Pomt2	rno-mir-130a-5p	2 (Microtar, Miranda)
Pomt2	rno-mir-351-3p	2 (Miranda, Microtar)
Ptgr2	rno-mir-145-3p	2 (Miranda, Microtar)
Ptgr2	rno-mir-145-5p	2 (Microtar, Miranda)
Ptgr2	rno-mir-194-3p	2 (Miranda, Microtar)
Ptgr2	rno-mir-195-3p	2 (Miranda, Microtar)
Rgd1310769	rno-mir-351-3p	2 (Microtar)
Tgfb3	rno-mir-130a-5p	2 (Microtar)
Tgfb3	rno-mir-145-3p	2 (Microtar, Miranda)
Tgfb3	rno-mir-195-5p	2 (Microtar, Miranda)
Tgfb3	rno-mir-351-5p	2 (Microtar)
Tgfb3	rno-mir-497-5p	2 (Miranda, Microtar)
Vsx2	rno-mir-195-5p	2 (Microtar, Miranda)
Ylpm1	rno-mir-195-3p	2 (Targetscan)
Ylpm1	rno-mir-195-5p	2 (Targetscan)
Ylpm1	rno-mir-497-3p	2 (Miranda, Microtar)
Zfyve1	rno-mir-195-5p	2 (Miranda, Targetscan)
Zfyve1	rno-mir-351-5p	2 (Miranda, Targetscan)

4. Diskussion

Diese Dissertation diente der Analyse renaler microRNA in dem genetischen Tiermodell der männlichen MWF-Ratte, die in die Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen bzw. Albuminurie involviert sind. Die MWF-Ratte entwickelt bereits in einem jungen Alter eine signifikante Albuminurie. Albuminurie ist auch beim Menschen mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden (Gansevoort und de Jong, 2009; Gansevoort et al., 2011; Heerspink and Gansevoort, 2015; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, 2010). Um die Pathophysiologie der Albuminurie zu verstehen ist es wichtig, genetische Grundlagen zu entschlüsseln.

Die Ergebnisse demonstrierten, dass zwischen den beiden Rattenstämmen SHR und MWF signifikante Expressionsunterschiede von microRNA zu kritischen Zeitpunkten in der Entwicklung der Albuminurie bestanden. Von den zehn nach dem Microarray-Profilung ausgewählten microRNA der 8 Wochen alten Tiere konnten 8 microRNA miR-150, miR-497, miR-351, miR-195, miR-145, miR-200a, miR-192, miR-194 durch RT-qPCR als signifikant differentiell exprimiert bestätigt werden. In der Gruppe der 24 Wochen alten Tiere konnte nur eine microRNA, miR-130a, als signifikant differentiell exprimiert bestätigt werden. Methodische Aspekte könnten die teilweise diskrepanten Ergebnisse erklären. Hierzu zählen die unterschiedlichen Gruppengrößen, potentielle Messfehler oder Limitationen der Microarray-Technik.

MiR-150 wurde mit der Entwicklung einer renalen Fibrose bei Lupus Nephritis in Zusammenhang gebracht (Zhou et al., 2016). In einem in vitro Experiment von Zhou et al. konnte gezeigt werden, dass unter anderem durch transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) die Expression von miR-150 in humanen Zellen des proximalen Tubulus und Podozyten gesteigert wird (Zhou et al., 2013). Hierdurch verminderte sich die Expression von suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1; Zhou et al. 2013). SOCS1 ist als negativer Modulator von profibrotischen Prozessen durch Beeinflussung des JAK/STAT-Signalwegs bekannt (Recio et al., 2017; Liu et al., 2011). Im Unterschied zum SHR-Stamm war miR-150 im MWF-Stamm deutlich stärker exprimiert. Dies könnte zu fibrotischen Umbauprozessen durch die oben beschriebene Inhibierung von Socs1 geführt haben. In den beiden Stämmen ist im Alter von 24 Wochen diese Ausprägung nicht mehr vorhanden. Der chronische Nierenschaden ist allerdings bei der MWF-Ratte

schon deutlich ausgeprägt. Zhou et al. untersuchten die Expression von SOCS1 und miR-150 auch in Nierenbiopsien von Patienten mit bekannter Lupusnephritis. Hier zeigten sich hohe Konzentrationen von SOCS1 bei Patienten mit einem niedrigen Chronicity Index (CI) für Lupus Nephritis. Dementsprechend war in negativer Korrelation die Expression von miR-150 bei Patienten mit einem hohen CI erhöht. Zhou et al. schlussfolgerten, dass SOCS1 demnach eine kompensatorische Rolle in den frühen Stadien einer renalen Fibrose spielte, und dass der Verlust von SOCS1 durch die vermehrte Expression von miR-150 zu einer Beschleunigung der Fibrosierung führte (Zhou et al., 2013). In Bezug auf diese Dissertation würde es bedeuten, dass es bereits fibrotische Umbauprozesse durch Verlust der Socs1-Funktion in den Nieren der 8 Wochen alten MWF-Ratten gäbe, während die Nieren des SHR-Stamms noch ihre volle Funktion unbeeinträchtigt ausübten. Allerdings liegt Socs1 nicht in einem der ermittelten Albuminurie-QTL, was gegen eine direkte Beteiligung an der Entstehung der Albuminurie spricht. Soweit es bekannt ist, dient Socs1 der Modulation der Proteinsynthese und übt somit nur einen indirekten Einfluss auf pathologische Prozesse aus. Auch Angel1 als mögliches Target-Gen der miR-150-Familie im Albuminurie-QTL auf RNO6 könnte eventuell eine modulatorische Rolle als Interaktionspartner für Transkriptionsfaktoren einnehmen (Gosselin et al., 2013). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Deletion von miR-150 durch Verwendung eines Knockout Stamms eine protektive Wirkung auf Endothelzellen der Niere bei einem Myokardinfarkt hat (Ranganathan et al., 2015). Diese protektive Eigenschaft ist möglicherweise durch Regulation von insulin like growth factor 1 receptor (IGF-1R) durch miR-150 verursacht (Ranganathan et al., 2015). Andererseits konnte eine Deregulation von miR-150 in Patienten mit kardialen Erkrankungen nachgewiesen werden (Goren et al., 2014; Tang et al., 2015). Dies stellt nicht nur eine mögliche Rolle von miR-150 als Mediator kardiovaskulärer Erkrankungen dar, sondern ebenso eine Gewebsspezifität für einzelne Organe. In anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es während des Alterungsprozesses bis hin zur 24 Wochen alten MWF- und SHR-Ratte zu einer Zunahme der Expression von miR-150 kam (Dissertation Viktor Kebede, 2016). Sowohl in Patienten mit Diabetes mellitus bedingten Nierenschäden mit Makroalbuminurie als auch in Patienten mit einer IgA-Nephropathie ist miR-150 im Urin stärker konzentriert als in gesunden Vergleichsproben (Szeto et al., 2019; Xie et al., 2017). Demnach könnte sich miR-150 als früher Marker zum Entstehen eines chronischen Nierenschadens eignen, noch bevor es zu messbar

erhöhten Parametern in der klinischen Chemie kommt. Außerdem könnte es für die Stadieneinteilung einer chronischen Niereninsuffizienz relevant sein. MiR-150 scheint nach aktuellen Erkenntnissen durchaus eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Niere zu besitzen.

MiR-497 konnte bislang in fast allen Organen nachgewiesen werden, darunter das Gehirn (Yang et al., 2013), die Lunge (Zhao et al., 2013), die Leber (Ruan et al., 2009), der Darm (Guo et al., 2008), das Blut (Du et al., 2015) und die Niere (Zhao et al., 2015). In einer Untersuchung an einem Mausmodell mit bleomycininduzierter Lungenfibrose war miR-497 hochreguliert (Chen et al., 2017). Eine Inhibierung von miR-497 im Modell führte zu einer Reduktion der ansonsten hochregulierten fibrotischen Marker matrix metalloproteinase-2 (Mmp2), matrix metalloproteinase-9 (Mmp9) und transforming growth factor beta 1 (Tgfb1) durch eine erhöhte Expression von Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (Reck; Chen et al., 2017). In der Niere wurde an Ratten mit diabetischer Nephropathie nachgewiesen, dass es durch erhöhte Konzentrationen von miR-497 zur Suppression von rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1 und 2 (Rock1 und Rock2) kommt (Liu et al., 2018). Rock1 und Rock2 sind Rho-assoziierte Kinasen, die ubiquitär vorkommen und als Mediatoren für verschiedene zelluläre Prozesse dienen. Unter anderem sind sie Mediatoren für die Entwicklung von mesenchymalen Zellen aus Epithelzellen (epithelial-mesenchymal transition, EMT) und sind damit an der Entwicklung einer erhöhten Durchlässigkeit für Proteine in den Glomeruli beteiligt (Peng et al., 2016). Scheinbar ist miR-497 in der Lage sowohl profibrotisch, als auch protektiv zelluläre Prozesse zu regulieren. Allerdings kodieren die genannten Gene nicht im Albuminurie-QTL auf RNO6. Von den durch miR-497 möglicherweise regulierten Genen im QTL (Aldh6a1, Angel1, Npc2, Tgfb3, Ylpm1) ist nur Tgfb3 bislang in Zusammenhang mit der Expressionsinduktion von Rock1 beschrieben (Sakabe et al., 2008). Eine Hochregulation von miR-497 in der MWF-Ratte würde nach derzeitigem Kenntnisstand zu einer verminderten Expression von Tgfb3 und damit zu einer verminderten Expression von Rock1 führen. Hier sind weitere experimentelle Untersuchungen notwendig, um den genauen Zusammenhang zwischen Rock1, Tgfb3 und miR-497 zu verstehen. Beispielsweise könnte an noch jüngeren Tieren untersucht werden, ob genetisch induzierte Prozesse bereits in der Embryonalphase zu der später entwickelten Albuminurie führen. Auch für miR-351 ein Zusammenhang bei der

Entstehung einer bleomycininduzierten pulmonalen Fibrose am Mausmodell beschrieben (Xie et al., 2011). Xie et al. untersuchten mittels Microarray die Expression von microRNA in der Akutphase mit Gewebsverletzung und in der Phase der Fibrose (Xie et al., 2011). Für miR-351 zeigte sich hier eine vermehrte Expression in der Akutphase. MiR-351 ist als Modulator von B-cell lymphoma 2 (Bcl2) charakterisiert worden und ist an Apoptosevorgängen der Zelle beteiligt (Xie et al., 2011). Außerdem ist bekannt, dass miR-351 in den Wnt-Pathway modulierend eingreift und dabei im Lungengewebe die Entstehung einer Fibrose unterstützt (Xie et al., 2011). Untersuchungen zur Fibrogenese in der Niere, allerdings an Tubulusepithelzellen, zeigten, dass der für die Zellkommunikation wichtige Wnt-Pathway hier an der Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz durch renale Fibrose beteiligt ist (Zhou et al., 2017). Weder die Gene für Bcl2, Bcl2-assoziierte Proteine noch für Proteine des Wnt-Pathway sind im Albuminurie-QTL zu finden, was vermuten lässt, dass diese Vorgänge nicht ursächlich für die Entstehung der Albuminurie in der MWF-Ratte sind. Von den durch Target Prediction Tools identifizierten Genen, die durch miR-351 möglicherweise moduliert werden (Ngb, Pomt2, Rgd1310769, Gstz1, Tgfb3 und Zfyve1), ist nur Tgfb3 in Zusammenhang mit Erkrankungen der Nieren beschrieben. Tgfb3 ist, wie bereits weiter oben aufgeführt, ein wichtiger Faktor für die EMT (Peng et al., 2016). Eine erhöhte Expression von miR-351 mit Tgfb3 als Target-Gen würde allerdings wieder einen protektiven Mechanismus beschreiben, da es zu einer vermehrten Degradation der mRNA oder zur Translationshemmung kommen würde. Da miR-351 ebenfalls nicht im Albuminurie-QTL kodiert, könnte hier eventuell eine organspezifische Antwort zur Nephroprotektion ursächlich für die gesteigerte Expression der microRNA verantwortlich sein. Sowohl miR-497 als auch miR-351 sind interessante Targets für weitere Untersuchungen um die Pathogenese der Albuminurie zu verstehen. Für beide microRNA könnten in Zukunft Experimente mit Anti-miRNA-Oligonukleotiden an der MWF-Ratte durchgeführt werden, um den Einfluss der beschriebenen Prozesse auf die Entwicklung der Albuminurie genauer zu untersuchen.

In einem Mausmodell der DBA/2-Maus mit einem frühen Stadium der diabetischen Nephropathie und einer Proteinurie zeigten sich mehrere microRNA stark verändert im Vergleich zur Kontrolle in den gewonnenen Glomeruli-Isolaten (Chen et al., 2012; Chen et al., 2011). Korrelierend zu den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation waren für

miR-192 und miR-194 eine geringere Expression in der DAB/2-Maus detektiert worden (Chen et al., 2012; Chen et al., 2011). MiR-195 hingegen stellte sich zwar ebenfalls geringer exprimiert dar, zeigte aber eine negative Korrelation zu Durchmesser der Glomeruli, der Zunahme der extrazellulären Matrix und zur Zunahme des Mesangiums (Chen et al., 2012; Chen et al., 2011). Chen et al. gingen davon aus, dass die Expression von miR-195 in den Zellen der Mausnieren herunterreguliert worden war, um eine protektive Wirkung auf die Apoptose der Nierenzellen auszuüben und damit eine Fibrosierung der Niere zu vermeiden. Dies wurde durch eine vermehrte Expression des miR-195-Targetgens Bcl2 und einer damit einhergehenden verminderten Expression von Caspase-3 und Caspase-6 erläutert (Chen et al., 2012; Chen et al., 2011). In der vorliegenden Dissertation konnte eine erhöhte Expression von miR-195 im Rattenmodell mit beginnender Albuminurie nachgewiesen werden. Damit einhergehend ist in Bezug auf die Ergebnisse von Chen et al. anzunehmen, dass durch die vermehrte miR-195-Expression Bcl2 durch Inhibierung der Translation in geringerer Konzentration vorliegen und es zu erhöhten Konzentrationen von Caspase-3 und Caspase-6 kommen könnte. Damit würde ein proapoptotisches Zellmilieu geschaffen. Ebenso wie in den Zellen der Mäuse mit diabetischer Nephropathie könnte man vermuten, dass eine vermehrte Expression von miR-195 zu vermehrter Glomerulosklerose führt und die Albuminurie und das chronische Nierenversagen bei den MWF-Ratten fördern könnte. Die Untersuchungen von Chen et al. fanden allerdings in einem hyperglykämischen Milieu statt und sind nicht ohne weitere Untersuchungen auf die MWF-Ratte übertragbar. Da die für die oben genannten Proteine kodierenden Gene nicht in dem Albuminurie-QTL der MWF-Ratte zu finden sind, scheint ein anderer Mechanismus für die Entstehung der Albuminurie verantwortlich zu sein. Außerdem ist die vermehrte Expression von miR-195 unter Umständen auf die pathologische Erhöhung der Glukosekonzentration zurückzuführen. Die identifizierten Target-Gene von miR-195 (Batf, Gatz1, Ptgr2, Ylpm1, Aldh6A1, Npc2, Tgfb3, Vsx2, Ylpm1, Zfyve1) sind bislang nicht in direktem Zusammenhang mit einer Albuminurie beschrieben. Tgfb3 ist auch für miR-195 ein mögliches Target-Gen und damit einhergehend könnte eine nephroprotektive Erhöhung der Expression von miR-195 angenommen werden (Peng et al., 2016). Ein weiteres Target-Gen für miR-195 ist Batf, welches als Transkriptionsfaktor für B- und T-Zellfunktionen agiert (Schraml et al., 2009; Betz et al., 2010; He et al., 2016). Außerdem wird Batf mit der Entstehung einer IgA-Nephropathie in Zusammenhang gebracht (He et

al., 2016). Im Fall der IgA-Nephropathie kommt es zu einer erhöhten Aktivität von Batf (He et al., 2016). In anderen Untersuchungen zeigte sich eine vermehrte Aktivität der durch Batf regulierten T_H17-Zellen in Autoimmunerkrankungen der Niere (Krebs et al., 2017). Eine Regulation von Batf durch microRNA würde somit zu einer verminderten Differenzierung von T_H17-Zellen führen und damit protektiv auf inflammatorische und autoimmunvermittelte Prozesse in der Niere wirken. Durch weitere Studien mit Knockout-Tieren oder Anti-miRNA Oligonukleotiden könnten die protektiven Auswirkungen der Tgfb3 und Batf beeinflussenden microRNA in zukünftigen Untersuchungen besser beurteilt werden. Eine prospektive Studie zur Beurteilung des jeweiligen Outcomes könnte zu dem Ergebnis kommen, dass die unterschiedlichen microRNA möglicherweise eine potenzierende Wirkung auf die Nierenfunktion und die Albuminurie haben.

In verschiedenen Studien wurde bereits über die Rolle von miR-192 in Zusammenhang mit unterschiedlichen Nephropathien, wie der diabetischen und der obstruktiven Nephropathie, berichtet (Kato et al., 2007; Deshpande et al., 2013; Chung et al., 2010). Nachweislich ist miR-192 an der Regulation von Genen beteiligt, die unter anderem im Zusammenhang mit der Entstehung und Progression der renalen Fibrose stehen. Beispielsweise konnten Kato et al. zeigen, dass miR-192 durch TGF- β 1, einem gut bekannten profibrotischen Mediator in der Niere, anscheinend induziert wird und es zu einem signifikanten Anstieg der Expression von miR-192 in mesangialen Zellen von Mäusen mit diabetischer Nephropathie kommt (Kato et al., 2007). Darüber hinaus konnte Zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) als Target-mRNA für miR-192 und ZEB2 als Co-Regulator für die E-box-Region des Collagen Type I Alpha 2 Chain-Gens (Col1a2) identifiziert werden (Kato et al., 2007). Diese Untersuchungen ließen vermuten, dass eine hochregulierte Expression von miR-192 zur Hemmung der ZEB2 regulierten Unterdrückung der E-box-Region von Col1a2 führt und dadurch zu einer Akkumulation von extrazellulärer Matrix (Kato et al., 2007). Im Einklang mit den Ergebnissen von Kato et al. stehen die Ergebnisse von Deshpande et al., die eine signifikante Verminderung der Proteinurie und Albuminurie bei miR-192-knockout-Mäusen (miR-192-KO-Mäuse) mit diabetischer Nephropathie und bei Mäusen, die mit LNA-anti-miR-192 (miR-192 Antagonist) behandelt wurden, verzeichnen konnten (Deshpande et al., 2013). Dies konnte nicht nur in Zellen des Mesangiums, sondern auch in glomerulären Zellen nachgewiesen werden (Deshpande et al., 2013). Deshpande et al. konnten darüber

hinaus darlegen, dass ein Fehlen von miR-192 in miR-192-KO-Mäusen nicht zu Fehlentwicklungen der Niere führte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass miR-192 ein wichtiger Bestandteil in der Entwicklung der diabetischen Nephropathie ist. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von miR-192 in den Glomeruli der 8 Wochen alten MWF-Ratte, im Gegensatz zur gleichalten SHR-Ratte, vermindert ist, obwohl es in der Folge zu der Entwicklung von Glomerulopathien und Albuminurie kommt. Dies könnte bedeuten, dass es einen weiteren Weg gibt, der zu Veränderungen des glomerulären Filtrationsapparates führt. Andererseits kann es sein, dass miR-192 zur Protektion der Glomeruli der MWF-Ratten bereits herunterreguliert worden war. Passend hierzu beschrieben Krupa et al. eine verminderte Expression von miR-192 in Biopsien von Nieren mit diabetischer Nephropathie. Die Ergebnisse korrelierten antiproportional mit zunehmender renaler Fibrose (Krupa et al., 2010). Die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Rolle von miR-192 könnten auf den unterschiedlichen Geweben beruhen in den die Untersuchungen stattgefunden haben. Außerdem können der Zeitpunkt und Art der Gewinnung der RNA zu Unterschieden beigetragen haben. Nicht zuletzt hat die MWF-Ratte kein hyperglykämies Milieu in dem die Nephropathie entsteht, also keine diabetische Nephropathie. Mladinov et al. detektierten beispielsweise bereits sehr unterschiedliche Konzentrationen von diversen microRNA, darunter auch miR-192, im proximalen Tubulussystem und im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (Mladinov et al., 2013). Auf die Unterschiede in der Expression von miR-192 gehen bereits Ma et al. ein und sehen die Ursache ebenfalls in der Art der untersuchten Gewebe, der unterschiedlichen Spezies, der unterschiedlichen Zelltypen (Podozyten, mesangiale Zellen, Zellen des Tubulussystems) und unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (Ma et al., 2016). Identifizierte Target-Gene für miR-192 sind Flvcr2 und Fos. Über Flvcr2 gibt es bislang keinen beschriebenen Zusammenhang zu renalen Pathologien. Durch Regulation von Fos durch miR-192 wird Einfluss auf Apoptosevorgänge durch Änderung der Bcl2-Expression genommen (Bai et al., 2014). Bai et al. untersuchten unter anderem die Auswirkungen eines Knockdowns der Gene Fos und Jun in männlichen Sprague Dawley-Ratten und kamen dabei zu dem Ergebnis, dass die Expression von Bcl2 gesteigert und dadurch die Apoptose von Podozyten gehemmt wurde (Bai et al., 2014). Die signifikant erniedrigte Expression von miR-192 bei der MWF-Ratte würde im Umkehrschluss zu einer vermehrten, beziehungsweise ungehemmten Expression von Fos führen und damit ein

proapoptotisches Zellmilieu schaffen. Die microRNA miR-195 und miR-351 greifen ebenfalls Bcl2-assoziiert in Apoptosevorgänge ein und könnten diese gemeinsam mit miR-192 aufrechterhalten oder verstärken (Xie et al., 2011; Chen et al., 2012; Chen et al., 2011).

Weitere Studien wären notwendig, um die Rolle von miR-192 exakter zu beschreiben. Beispielsweise könnten an größeren Kohorten mit unterschiedlichen Nephropathien vergleichende Untersuchungen durchgeführt werden, die die gleiche Art der Gewebegewinnung und Präparation verwenden. Könnte die Rolle von miR-192 in der Entstehung und Aufrechterhaltung der renalen Glomerulo- und Nephropathien exakter beschrieben werden, ließen sich möglicherweise gezielte medikamentöse Therapien entwickeln, die die Nierenfunktion langfristig verbessern könnte.

In dieser Dissertation zeigte sich, dass miR-194 im Rattenmodell mit Albuminurie eine geringere Expression im Vergleich zum nierengesunden SHR-Stamm aufweist. Sun et al. beschrieben miR-194 bereits als microRNA, die im Nierengewebe sehr charakteristisch vertreten ist und stark exprimiert wird im Vergleich zu anderen Organen (Sun et al., 2004). Sun et al. formulierten die Hypothese, dass miR-194 zusammen mit miR-192 als gemeinsames Transkript reguliert wird, da die beiden microRNA nur 109 bp voneinander entfernt auf Chromosom 11 lokalisiert sind (Sun et al., 2004). In einem Modell mit ischämischer Reperfusionverletzung der Niere war miR-194 zwar herunterreguliert, aber im Vergleich zu anderen microRNA, die eine deutlichere Änderung ihrer Expression aufwiesen, blieb miR-194 in den Konzentrationsbereichen der Vergleichsgruppe (Godwin et al., 2010). Die ischämische Reperfusionverletzung führt, nach dem Fehlen von Sauerstoff und Nährstoffen durch eine Ischämie, nach Wiederherstellung der Zirkulation zu Inflammation und oxidativem Schaden durch oxidativen Stress (Carden et al., 2000). In einer Studie zur Identifizierung möglicher Biomarker für die diabetische Nephropathie zeigten Jia et al., dass es unter anderem zu einer erhöhten Konzentration von miR-192 und miR-194 in extrazellulären Vesikeln im Urin von Patienten mit Mikroalbuminurie kam, aber zu einem Abfall der Konzentration beider microRNA im Urin von Patienten mit Makroalbuminurie (Jia et al., 2016). Die Pathogenese hinter den Konzentrationsunterschieden bleibt unklar, scheint aber möglicherweise mit der Schwere der Niereninsuffizienz zusammenzuhängen. Eine Studie, die die Konzentrationen der beiden microRNA, miR-192 und miR-194, in den

extrazellulären Vesikeln im Urin, in den Glomeruli und in den Tubuluszellen untersucht und dabei auf Tiermodelle mit unterschiedlich schwerer Niereninsuffizienz zurückgreift wäre denkbar und könnte mehr Aufschluss über die Funktionsweise der beiden microRNA bieten. Dabei könnte die Vermutung von Jia et al., dass eine oder beide microRNA als Biomarker dienen könnten, bestätigt werden (Jia et al., 2016). Die identifizierten Target-Gene für miR-192 (Elmsan1, Ptgr2, Flvcr2) sind bislang nicht mit Nephropathien assoziiert. Es ist aber durchaus möglich, dass in zukünftigen Studien die Wirkung der Gene genauer beschrieben werden kann und dadurch ein Zusammenhang zur Albuminurie entsteht.

Die microRNA miR-145 wurde in den Glomeruli der Niere der MWF-Ratte ebenfalls im Vergleich zum SHR-Rattenstamm signifikant vermehrt exprimiert. Kito et al. führten eine Reihe von Untersuchungen durch, um einzelne tubuläre Strukturen anhand von microRNA-Expression zu differenzieren (Kito et al., 2015). Daraus wollten sie Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Ursachen und Stadien der akuten und chronischen Niereninsuffizienz ziehen (Kito et al., 2015). In ihrem Experiment zeigten sie, dass miR-145 in mesangialen Zellen wesentlich stärker exprimiert wird als in Zellen des proximalen Tubulus (Kito et al., 2015). MiR-145 scheint daher sehr spezifisch für das Glomerulum beziehungsweise das Mesangium zu sein und wäre damit ein potentieller Biomarker für glomeruläre Schäden. In anderen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass miR-145 vor allem in der glatten Muskulatur von Gefäßen exprimiert wird und dort unter anderem für die Differenzierung der Zellen nach Verletzungen verantwortlich ist (Xin et al., 2009). In einer Untersuchung von Ratten mit chronischer Niereninsuffizienz waren die Konzentrationen von microRNA, die in Zusammenhang mit der Proliferation und Differenzierung von glatter Gefäßmuskulatur stehen, in der Aorta der Tiere im Vergleich zu einem nierengesunden Stamm vermindert (Chen et al., 2013). Darunter unter anderem auch miR-145. Die genutzten Tiermodelle waren allerdings Ratten mit weit fortgeschrittener chronischer Niereninsuffizienz, einer linksventrikulären Hypertrophie, Arteriosklerose und Bluthochdruck (Rattenstamm: Han:SPRD Cy/+IU; Chen et al., 2013). Cheng et al. zeigten, dass eine erhöhte Konzentration von miR-145 zu einer schlechteren Entdifferenzierung von glatter Gefäßmuskulatur und einer verminderten Reparatur von beschädigter Intima führte (Cheng et al., 2009). In Bezug auf dieses Experiment würde das bedeuten, dass die erhöht exprimierte miR-145 in den Glomeruli zu einem

reduzierten Schutz vor Gefäßverletzungen und fehlender Differenzierung der glatten Muskelzellen der Gefäße führt und so ein chronischer Gefäßschaden entsteht und unterhalten wird. Als Target-Gene für miR-145 im Albuminurie-QTL sind *Ltbp2*, *Ngb*, *Ptgr2*, *Tgfb3*, *Npc2*, *Pgf* und *Ptgr2* identifiziert worden. Nur für *Pgf* und *Tgfb3* sind mögliche Zusammenhänge mit der Entstehung einer Albuminurie bisher beschrieben. Bei einem akuten Nierenversagen nach Herzoperationen kam es zu einem Anstieg der proangiogenetischen Marker VEGF und PGF und in Korrelation mit einer erhöhten Konzentration der Marker zu einem geringeren Risiko für ein akutes Nierenversagen (Mansour et al., 2019). *Pgf* scheint also in der akuten Niereninsuffizienz eine protektive Aufgabe wahrzunehmen. Dies entspricht den Beobachtungen von Cheng et al., die miR-145 in Verbindung mit anhaltenden und akuten Gefäßschädigungen brachten (Cheng et al., 2009). Durch eine bereits früh bestehende erhöhte Expression von miR-145 könnte es zu einer schlechteren Entdifferenzierung des Mesangiums kommen und dadurch eine endotheliale Dysfunktion bei der MWF-Ratte entstehen. Darüber hinaus würde die anhaltende erhöhte Expression von miR-145 zu fehlenden Reparaturvorgängen an den Mesangiumzellen führen. Eine Suppression von *Tgfb3* durch die erhöhte Expression von miR-145 führt wiederum zu einer Nephroprotektion durch Verhinderung der EMT (Peng et al., 2016). Dies sind gegensätzliche Eigenschaften dieser microRNA. Weitere Experimente wären notwendig, um die Rolle und Expression dieser microRNA weiter zu spezifizieren.

Zahlreiche Studien haben bereits die Pathogenese der renalen Fibrose untersucht und sind zu dem Schluss gekommen, dass unter anderem TGF- β 1 eine entscheidende Rolle als profibrotisches Zytokin in der Entstehung dieser zukommt (Böttinger et al., 2002). Xiong et al. untersuchten die Expression diverser microRNA an verschiedenen Modellen mit Nephropathie (Xiong et al., 2012). Hierzu führten sie Experimente mit unilateraler urethraler Obstruktion an verschiedenen Tiermodellen der Maus und Ratte durch. In ihrer Studie zeigte sich unter anderem eine geringere Expression von miR-200a ab dem ersten Tag der Obstruktion (Xiong et al., 2012). In der gleichen Studie wird eine TGF- β 1-induzierte renale Fibrose in vitro an Zellen des proximalen Tubulusepithels untersucht (NRK-52E). Hier bestand eine Abhängigkeit der verminderten Expression von miR-200a zum Smad-Pathway (Xiong et al., 2012). Die reduzierte Expression der untersuchten miR-200-Familie induzierte wiederum eine tubuläre Transition von Epithel zu

Mesenchym. Xiong et al. kamen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass durch die gesamte miR-200-Familie ein protektiver Mechanismus auf das Tubulusepithel des proximalen Tubulus der Niere ausgeht (Xiong et al., 2012). In dieser Dissertation konnte miR-200a im Glomerulum der Rattennieren nachgewiesen werden. Hier könnte dieser microRNA eine protektive Rolle zukommen. Zhang et al. wiesen nach, dass eine glomeruläre Fibrose durch den TGF- β 1/Smad-Signalweg induziert wird (Zhang et al., 2017). Folglich kommt es in glomerulären Zellen zu einer Verminderung von miR-200a und zu einem Verlust der protektiven Wirkung auf fibrotische Umbauprozesse. Neben der Wirkung auf glomeruläre Fibrosierung kommt miR-200a ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Differenzierung der Podozyten zu. In einem Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass miR-200a, miR-200b und miR-429 (Mitglieder der miR-200-Familie) an der Differenzierung von Podozyten pränatal und postnatal beteiligt sind (Li et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung dieser microRNA zu Inhibition von Zelldifferenzierung und von Apoptosevorgängen führte (Li et al., 2016). In Bezug auf die Glomeruli der MWF-Ratte bedeutet dies, dass die geringe Expression von miR-200a bei der MWF-Ratte, die in dieser Dissertation nachgewiesen werden konnte, möglicherweise einen negativen Einfluss auf die gesunde Entwicklung der Podozyten in der postnatalen Phase hat und damit wichtige Reparatur- und Differenzierungsvorgänge der Podozyten gehemmt wären. Weitere Untersuchungen bei jüngeren MWF-Ratten, gegebenenfalls pränatal, wären interessant, um Rückschlüsse auf die Podozytenfunktion und deren Entwicklung im Rahmen progredienter Nephropathien bei den Stämmen MWF und SHR vorzunehmen. Die Entwicklung einer Targeting-Therapie zur Hemmung einer Nephropathie und möglicherweise auch der Wiederherstellung der Filtrationsfunktion durch Neudifferenzierung von gesunden Podozyten ist in Zukunft denkbar. Gerade in Bezug auf die Entwicklung einer Albuminurie kommt den Podozyten, als Teil des glomerulären Filtrationsapparates, eine wichtige Bedeutung zu (Shankland, 2006, Kriz et al., 1998). MiR-200a und darüber hinaus die gesamte miR-200-Familie scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Nierenfunktion auszuüben.

In einer weiteren Studie wurde die Rolle von miR-200a in der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie untersucht (Wie et al., 2014). Wie et al. demonstrierten, dass durch die Administration von miR-200a-3p-Inhibitoren in einem Mausmodell der C57BL/6-Maus mit Diabetes mellitus die Fibrogenese und Albuminurie signifikant

gesteigert wurden und zu einer diabetischen Nephropathie führten (Wie et al., 2014). Wei et al. führten an, dass in ihrem Modell die Expression von miR-200a-3p durch die durch Hyperglykämie induzierte Aldosereduktase signifikant gedrosselt werden konnte (Wie et al., 2014). In einer anderen Untersuchung wiesen sie nach, dass eine Überexpression von miR-200a-3p zu einer signifikanten Herunterregulation von vier wichtigen profibrotischen Genen Tgf β 1, Tgf β 2, collagen IV (Col4) und fibronectin (Fn) führte (Wei et al., 2014). Die Vermutung lag demnach nahe, dass eine enge Verbindung zwischen Fibrogenese und mir-200a-3p bestehen könnte. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass miR-200a im Vergleich zu einem nierengesunden Rattenstamm in den Glomeruli der Niere signifikant erniedrigt ist. Auch wenn in diesem Tiermodell keine Hyperglykämie diese Hemmung der microRNA-Expression hervorgerufen hat, kann doch angenommen werden, dass durch die fehlende Expression von miR-200a es ebenso zu einer vermehrten Fibrogenese und damit zu einem chronischen Nierenversagen mit Albuminurie kommen könnte. Zumal Wei et al. nachwiesen, dass miR-200a direkt mit den microRNA recognition elements auf den 3'UTR von Tgf β 2 und Fn interagierten (Wei et al., 2014). Eine Hyperglykämie scheint demnach nicht notwendige Bedingung zu sein, um im hier genutzten Rattenmodell mit verminderter Expression von miR-200a eine Fibrosierung hervorzurufen. Auch wenn die oben genannten profibrotischen Gene nicht in einen Albuminurie-QTL kodieren, kann es doch sein, dass die verminderte Expression von miR-200a zu einer Aufrechterhaltung der Nierenschädigung führt. Der Grund der verminderten Expression von miR-200a in den Glomeruli der MWF-Ratte sollte in weiteren Studien untersucht werden. Das in dieser Dissertation identifizierte Target-Gen für miR-200a (Ccdc176) ist bislang noch nicht in Zusammenhang mit renalen Pathologien beschrieben. Es bleibt abzuwarten, ob weitere Experimente, zum Beispiel mit Knockout-Tieren, in Zukunft mehr Aufschluss darüber geben können. In der Kohorte der 24 Wochen alten Ratten konnte als einzige microRNA miR-130a zwischen dem MWF-Stamm und dem SHR-Stamm als unterschiedlich exprimiert bestätigt werden. Dabei war miR-130a im Vergleich zum SHR-Stamm bei der MWF-Ratte herunterreguliert. Barutta et al. konnten eine erhöhte Konzentration von miR-130a in extrazellulären Vesikeln des Urins von Patienten mit Mikroalbuminurie und diabetischer Nephropathie nachweisen (Barutta et al., 2013), was bei Patienten mit einer eGFR unter $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2}$ durch Muralidharan et al. bestätigt wurde (Muralidharan et al., 2017). De Palma et al. diskutierten in diesem Zusammenhang die mögliche Nutzung von microRNA und

Proteinen als kombinierte Biomarker, welche die diagnostischen Möglichkeiten stark erweitern würden (De Palma et al., 2016). Die niedrige Expression von miR-130a in den Glomeruli der 24 Wochen alten MWF-Ratten macht einen Zusammenhang mit der erhöhten Konzentration dieser microRNA in den extrazellulären Vesikeln im Urin vorstellbar, da diese durch Exozytose aus den Zellen der Glomeruli in den Urin gelangen könnten. In einer Studie zur Rolle von microRNA bei der Umgestaltung von Blutgefäßen zeigte sich, dass miR-130a ein Regulator der Angiogenese und der Proliferation und Migration von Gefäßendothel ist (Fang et al., 2015). Zu den identifizierten Target-Genen von miR-130a (Flvcr2, Gatz1, Nek9, Batf, Gatz1, Pgf, Pomt2, Tgfb3) zählen Tgfb3 und Pgf, die bereits an anderer Stelle in dieser Dissertation in Zusammenhang mit EMT und Angiogenese beschrieben wurden (Peng et al., 2016; Cheng et al., 2009; Mansour et al., 2019). Die verminderte Expression von miR-130a würde wiederum zu scheinbar gegensätzlichen Mechanismen führen. Als Modulator von Tgfb3 würde eine erniedrigte Expression von miR-130a zur vermehrten Transition von Endothel zu Mesenchym führen und damit eine Proteinurie aggravieren (Peng et al., 2016). Im Gegensatz dazu führt eine ungehemmte Expression von Pgf durch gesteigerte Angiogenese zu einer möglichen Nephroprotektion (Mansour et al., 2019). Die scheinbar gegensätzlichen Mechanismen verdeutlichen die Wirkungsweise von microRNA als Modulatoren in zellulären Prozessen. Interessant ist der Unterschied zwischen den 8 Wochen alten und 24 Wochen alten MWF-Ratten in Bezug auf die Modulation von Tgfb3 und Pgf. Bei den 8 Wochen alten Tieren führt die erhöhte microRNA-Expression zu einer Unterbrechung der Proteinsynthese von Tgfb3 und Pgf. Wohingegen bei den 24 Wochen alten Tieren eine verminderte Expression von miR-130a zu einem umgekehrten Mechanismus führt. Dieser Unterschied könnte auf die aggravierte Chronifizierung des Nierenschadens bei den deutlich älteren Ratten hinweisen. Es wären weitere Untersuchungen an MWF-Ratten verschiedener Altersgruppen notwendig um den Zeitpunkt der unterschiedlichen microRNA-Expression genauer zu bestimmen und möglicherweise einen Übergang in ein höheres Stadium der Niereninsuffizienz zu detektieren. Weitere Studien bestätigten PGC1 α als Target-Gen von miR-130a. PGC1 α ist ein wichtiger Co-Aktivator von Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor γ (PPAR γ), einem wichtigen Bestandteil der Glukose- und Lipidregulation und Ziel der Therapie mit Insulin-Sensitizern (Portius et al., 2017). Außerdem wird ein möglicher Zusammenhang von PPAR γ mit der Nierenfunktion diskutiert (Ahmadian et al., 2013). Weitere Studien zur Charakterisierung dieser

Zusammenhänge sind notwendig um die Rolle von miR-130a und mögliche Pathomechanismen von PGC1 α und PPAR γ zu beschreiben. Allerdings kartieren die zugehörigen Gene nicht in einem Albuminurie-QTL, was einen Zusammenhang beim MWF-Modell unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Keine der in der vorliegenden Arbeit identifizierten microRNA kartierte in eine der bekannten Albuminurie-QTL der MWF-Ratte. Für die in dieser Dissertation konfirmierten glomerulären microRNA konnte über mirGate, einem Target Prediction Tool, positive Vorhersagen getroffen werden, dass Gene in dem MWF-QTL auf RNO6 durch diese microRNA reguliert werden könnten. Hierbei wurden in den meisten Fällen nur über ein oder zwei Datenbanken mögliche microRNA-mRNA Paarungen identifiziert. In einigen Fällen zeigte eine Datenbank mehrere Bindungsmöglichkeiten an die gleiche mRNA. Die von mirGate adressierten Datenbanken Tarbase, miRTarbase und miRecords verwenden nur experimentell bestätigte microRNA-mRNA-Paarungen (Andrés-León et al., 2015). Keine dieser Algorithmen detektierte eine passende Paarung zwischen mRNA auf dem QTL in RNO6 und den identifizierten microRNA. Durch die Verwendung von mirGate konnte somit gezeigt werden, dass keine der identifizierten microRNA bislang experimentell als Regulatoren der im Albuminurie-QTL enthaltenen Gene identifiziert wurden. TargetScan, Pita, Miranda, RNAhybrid und Microtar wurden programmiert eine möglichst hohe Komplementarität der Nukleotide von mRNA und microRNA zu erkennen, wobei jedes Programm unterschiedliche Ansätze dabei verfolgt und diese nicht miteinander vergleichbar sind (Andrés-León et al., 2015). Trotz vieler Jahre der Entwicklung ist es bislang nicht gelungen einen Algorithmus zu entwickeln, der zuverlässig richtige Vorhersagen treffen kann. Viele der möglichen Paarungen werden in nachfolgenden Untersuchungen als falsch positiv identifiziert (Prinzón et al., 2017). Die Verwendung von mirGate verbessert nach Angabe des Programmierers die Rate von falsch positiven Vorhersagen zu richtigen Vorhersagen um mindestens 10% (Andrés-León et al., 2015). Auch andere Publikationen empfehlen die Verwendung von mehreren Vorhersagewerkzeugen, um die Wahrscheinlichkeit eines richtig positiven Ergebnisses zu verbessern (Schäfer und Ciaudo, 2020). Andrés-León et al. beschreiben, dass ein richtig positives Ergebnis bereits wahrscheinlicher wird, wenn die microRNA-mRNA-Paarung in mindestens zwei Datenbanken vorhergesagt wird (Andrés-León et al., 2015).

Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Prozentsatz für falsch positive Ergebnisse nahezu bei 50% liegt (Pinzón et al., 2017).

Das Target-Gen mit den meisten, insgesamt vier, Vorhersagen durch Target Prediction Tools war basic leucine zipper ATF-like transcription factor (Batf). Allerdings erfolgten die Vorhersagen nur für ein Target Prediction Tool (TargetScan) für jeweils unterschiedliche Bindungsstellen auf der mRNA. Es ist unklar, wie diese Vorhersage einzuordnen ist. Die Vorhersagen von nur einem Target Prediction Tool sind mit geringerer Wahrscheinlichkeit richtig positiv (Andrés-Leon et al., 2015). Wie bereits beschrieben ist Batf ein Transkriptionsfaktor für unterschiedliche zelluläre Prozesse von B- und T-Zellen (Schraml et al., 2009; Betz et al., 2010; He et al., 2016) und steht außerdem in Zusammenhang mit der IgA-Nephropathie (He et al., 2016). Die erhöhte Aktivität von Batf in der IgA-Nephropathie könnte durch eine verminderte Konzentration von miR-130a und anderen regulierenden microRNA verursacht sein. Aufgrund der verminderten Expression von miR-130a beim MWF-Rattenmodell wäre es möglich, dass die Progredienz der Nierenschädigung durch diese Fehlregulation getriggert wird. Als Ursache für die Entstehung der Albuminurie bei jüngeren Tieren würde dieser Expressionsunterschied allerdings nicht in Frage kommen, da er erst bei den 24 Wochen alten Tieren detektiert wurde. Er könnte somit im weiteren Altersverlauf der Tiere die Albuminurie zusätzlich triggern.

Zur Klärung der Frage, ob und in welcher Form microRNA für die Entstehung der Albuminurie bei der MWF-Ratte verantwortlich sind, müssen weitere experimentelle Analysen, ausgehend von den in Tabelle 5 aufgeführten microRNA-mRNA-Paaren, zum Beispiel mit Knockout-Tieren, microRNA-Inhibitoren oder microRNA-Überexpressionsversuchen vorgenommen werden.

Zusätzlich wären für die Konfirmierung der Genregulation durch die identifizierten microRNA weitere umfangreiche Untersuchungen notwendig.

Die Beteiligung von microRNA an der Genexpression führte zu einem neuen Verständnis über die Zellregulation und die darin involvierten Prozesse. Die Prozesse, die zur Entstehung der Albuminurie beim humanen Patienten und bei Tiermodellen führen, können über das Verständnis der microRNA-Regulationsmechanismen weiter vertieft werden. In Bezug auf Nephropathien, welche mit einer Reihe von Komorbiditäten

einhergehen, stellt die Entdeckung der Genregulation durch microRNA eine Möglichkeit zum Verständnis der Erkrankung, zur Entwicklung von Biomarkern und zur Konzeption von Therapien dar.

5. Literaturverzeichnis

Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013 May;19(5):557-66.

Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):350-5.

Andrés-León E, González Peña D, Gómez-López G, Pisano DG. miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA-mRNA targets. *Database (Oxford)*. 2015 Apr 8;2015:bav035.

Bai X, Geng J, Li X, Yang F, Tian J. VEGF-A inhibition ameliorates podocyte apoptosis via repression of activating protein 1 in diabetes. *Am J Nephrol*. 2014;40(6):523-34.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.

Barutta F, Tricarico M, Corbelli A, Annaratone L, Pinach S, Grimaldi S, Bruno G, Cimino D, Taverna D, Deregibus MC, Rastaldi MP, Perin PC, Gruden G. Urinary exosomal microRNAs in incipient diabetic nephropathy. *PLoS One*. 2013 Nov 4;8(11):e73798.

Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonné R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*. 2003 Nov 15;31(22):6593-7.

Betz BC, Jordan-Williams KL, Wang C, Kang SG, Liao J, Logan MR, Kim CH, Taparowsky EJ. Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *J Exp Med*. 2010 May 10;207(5):933-42.

Blahna MT, Hata A. Regulation of miRNA biogenesis as an integrated component of growth factor signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2013 Apr;25(2):233-40.

Böttinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Oct;13(10):2600-10.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000 Feb;190(3):255-66.

Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Jun;21(3):452-60.

Chen NX, Kiattisunthorn K, O'Neill KD, Chen X, Moorthi RN, Gattone 2nd VC, Allen MR, Moe SM. Decreased MicroRNA Is Involved in the Vascular Remodeling Abnormalities in Chronic Kidney Disease (CKD). *PLoS ONE* 2013; 8(5):e64558.

Chen X, Shi C, Wang C, Liu W, Chu Y, Xiang Z, Hu K, Dong P, Han X. The role of miR-497-5p in myofibroblast differentiation of LR-MSCs and pulmonary fibrogenesis. *Sci Rep.* 2017 Jan 18;7:40958.

Chen YQ, Wang XX, Yao XM, Zhang DL, Yang XF, Tian SF, Wang NS. Abated microRNA-195 expression protected mesangial cells from apoptosis in early diabetic renal injury in mice. *J Nephrol.* 2012 Jul-Aug;25(4):566-76.

Chen YQ, Wang XX, Yao XM, Zhang DL, Yang XF, Tian SF, Wang NS. MicroRNA-195 promotes apoptosis in mouse podocytes via enhanced caspase activity driven by BCL2 insufficiency. *Am J Nephrol.* 2011;34(6):549-59.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005 Aug 4;436(7051):740-4.

Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA, Huo Y, Delphin ES, Zhang C. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res.* 2009 Jul 17;105(2):158-66.

Chilosi M, Poletti V, Zamò A, Lestani M, Montagna L, Piccoli P, Pedron S, Bertaso M, Scarpa A, Murer B, Cancellieri A, Maestro R, Semenzato G, Doglioni C. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1495-502.

Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J, Gansevoort RT. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet.* 2010 Jun 12;375(9731):2073-81.

Chung AC, Huang XR, Meng X, Lan HY. miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Aug;21(8):1317-25.

Chung ACK, Yu X, Lan HY. MicroRNA and nephropathy: emerging concepts. *Int J of Nephrol Renovasc Dis* 2013; 6:169–179.

Dai Q, Zhao J, Qi X, Xu W, He X, Guo M, Dweep H, Cheng WH, Luo Y, Xia K, Gretz N, Huang K. MicroRNA profiling of rats with ochratoxin A nephrotoxicity. *BMC Genomics*. 2014 May 5;15(1):333.

De Fougères 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 Palma G, Sallustio F, Schena FP. Clinical Application of Human Urinary Extracellular Vesicles in Kidney and Urologic Diseases. *Int J Mol Sci* 2016; 17(7). pii:E1043.

Deshpande SD, Putta S, Wang M, Lai JY, Bitzer M, Nelson RG, Lanting LL, Kato M, Natarajan R. Transforming growth factor- β -induced cross talk between p53 and a microRNA in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2013 Sep;62(9):3151-62.

Du M, Shi D, Yuan L, Li P, Chu H, Qin C, Yin C, Zhang Z, Wang M. Circulating miR-497 and miR-663b in plasma are potential novel biomarkers for bladder cancer. *Sci Rep*. 2015 May 27;5:10437.

Duan LJ, Ding M, Hou LJ, Cui YT, Li CJ, Yu DM. Long noncoding RNA TUG1 alleviates extracellular matrix accumulation via mediating microRNA-377 targeting of PPAR γ in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 484(3):598-604.

Fang YC, Yeh CH. Role of microRNAs in Vascular Remodeling. *Curr Mol Med* 2015; 15(8):684-96.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9(2):102-14.

Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*. 2005 Jun;15(3):331-41.

Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 2005; 122(1):17-20.

Gansevoort RT, de Jong PE. The case for using albuminuria in staging chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(3):465-8.

Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. 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 Jul;80(1):93-104.

Ganten D, de Jong W (1994): Handbook of Hypertension, Vol. 16: Experimental and genetic models of hypertension. Elsevier Science B. V.

Godwin JG, Ge X, Stephan K, Jurisch A, Tullius SG, Iacomini J. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(32):14339-14344.

Goren Y, Meiri E, Hogan C, Mitchell H, Lebanony D, Salman N, Schliamser JE, Amir O. Relation of reduced expression of MiR-150 in platelets to atrial fibrillation in patients with chronic systolic heart failure. *Am J Cardiol.* 2014 Mar 15;113(6):976-81

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Database issue):D154-D158.

Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(Database issue):D109-11.

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* 2001 Jul 13;106(1):23-34.

Gosselin P, Martineau Y, Morales J, Czjzek M, Glippa V, Gauffeny I, Morin E, Le Corguillé G, Pyronnet S, Cormier P, Cosson B. Tracking a refined eIF4E-binding motif reveals Angel1 as a new partner of eIF4E. *Nucleic Acids Res.* 2013 Sep;41(16):7783-92.

Guo J, Miao Y, Xiao B, Huan R, Jiang Z, Meng D, Wang Y. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Apr;24(4):652-7.

Hackbarth H, Büttner D, Jarck D, Pothmann M, Messow C, Gärtner K. Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Frömter (MWF) rats. *Ren Physiol* 1983; 6:63-71.

Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Goldberg S, Schermer B, Harfe BD, McManus MT, Benzing T, Miner JH. Podocyte-specific deletion of *dicer* alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;19(11):2150-8.

He L, Peng X, Chen Y, Liu G, Liu Z, Zhu J, Liu Y, Liu H, Liang Y, Liu F, Sun L, Peng Y. Regulation of IgA Class Switch Recombination in Immunoglobulin A Nephropathy: Retinoic Acid Signaling and BATF. *Am J Nephrol*. 2016;43(3):179-94.

Ho J, Ng KH, Rosen S, Dostal A, Gregory RI, Kreidberg JA. Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;19(11):2069-75.

Ho J, Pandey P, Schatton T, Sims-Lucas S, Khalid M, Frank MH, Hartwig S, Kreidberg JA. The pro-apoptotic protein Bim is a microRNA target in kidney progenitors. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Jun;22(6):1053-63.

Hong JP, Li XM, Li MX, Zheng FL. VEGF suppresses epithelial-mesenchymal transition by inhibiting the expression of Smad3 and miR-192, a Smad3-dependent microRNA. *Int J Mol Med*. 2013 Jun;31(6):1436-42.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001 Aug 3;293(5531):834-8.

Ijpeelaar DH, Schulz A, Koop K, Schlesener M, Bruijn JA, Kerjaschki D, Kreutz R, de Heer E. Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Frömter rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Apr;294(4):F758-67.

Ijpeelaar DH, Schulz A, Koop K, Schlesener M, Bruijn JA, Kerjaschki D, Kreutz R, de Heer E. Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Frömter rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Apr;294(4):F758-67.

Jia Y, Guan M, Zheng Z, Zhang Q, Tang C, Xu W, Xiao Z, Wang L, Xue Y. miRNAs in Urine Extracellular Vesicles as Predictors of Early-Stage Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res.* 2016;2016:7932765.

Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, Natarajan R. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 27;104(9):3432-7.

Kebede, Viktor. Bedeutung der glomerulären Expression von microRNAs bei der Munich Wistar Frömter-Ratte. Dissertation, Charité - Universitätsmedizin Berlin 2016.

Kito N, Endo K, Ikesue M, Weng H, Iwai N. miRNA Profiles of Tubular Cells: Diagnosis of Kidney Injury. *Biomed Res Int.* 2015;2015:465479.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D68-73.

Krebs CF, Schmidt T, Riedel JH, Panzer U. T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Oct;13(10):647-659.

Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M. Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J Hypertens.* 2000 Jun;18(6):777-82.

Kriegel AJ, Mladinov D, Liang M. Translational study of microRNAs and its application in kidney disease and hypertension research. *Clin Sci (Lond).* 2012 May 1;122(10):439-47.

Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int.* 1998 Sep;54(3):687-97.

Krupa A, Jenkins R, Luo DD, Lewis A, Phillips A, Fraser D. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Mar;21(3):438-47.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001 Oct 26;294(5543):853-8.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA.* 2003 Feb;9(2):175-9.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002 Apr 30;12(9):735-9.

Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci*. 2011;7(7):1056-67.

Lee HW, Khan SQ, Khaliqdina S, Altintas MM, Grahammer F, Zhao JL, Koh KH, Tardi NJ, Faridi MH, Geraghty T, Cimbaluk DJ, Susztak K, Moita LF, Baltimore D, Tharaux PL, Huber TB, Kretzler M, Bitzer M, Reiser J, Gupta V. Absence of miR-146a in Podocytes Increases Risk of Diabetic Glomerulopathy via Up-regulation of ErbB4 and Notch-1. *J Biol Chem*. 2017 Jan 13;292(2):732-747.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9.

Levey AS, Inker LA. Assessment of Glomerular Filtration Rate in Health and Disease: A State of the Art Review. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 Sep;102(3):405-419.

Li R, Chung AC, Yu X, Lan HY. MicroRNAs in Diabetic Kidney Disease. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:593956.

Li Z, Wang L, Xu J, Yang Z. MiRNA expression profile and miRNA-mRNA integrated analysis (MMIA) during podocyte differentiation. *Mol Genet Genomics*. 2015 Jun;290(3):863-75.

Li Z, Yin H, Hao S, Wang L, Gao J, Tan X, Yang Z. miR-200 family promotes podocyte differentiation through repression of RSAD2. *Sci Rep*. 2016 Jun 2;6:27105.

Lippert, Herbert. *Lehrbuch Anatomie* 6. Auflage. Urban & Fischer Verlag.

Liu L, Li Y, Liu S, Duan Q, Chen L, Wu T, Qian H, Yang S, Xin D. Downregulation of miR-193a-3p inhibits cell growth and migration in renal cell carcinoma by targeting PTEN. *Tumour Biol*. 2017 Jun;39(6):1010428317711951.

Liu LJ, Yu JJ, Xu XL. MicroRNA-93 inhibits apoptosis and promotes proliferation, invasion and migration of renal cell carcinoma ACHN cells via the TGF- β /Smad signaling pathway by targeting *RUNX3*. *Am J Transl Res*. 2017 Jul 15;9(7):3499-3513.

Liu Q, Liu S, Shi Y, Li H, Hao J, Xing L, Cao Y, Duan H. Suppressors of cytokine signaling inhibit tubular epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation. *Am J Nephrol*. 2011;34(2):142-51.

Liu F, Zhang S, Xu R, Gao S, Yin J. Melatonin Attenuates Endothelial-to-Mesenchymal Transition of Glomerular Endothelial Cells via Regulating miR-497/ROCK in Diabetic Nephropathy. *Kidney Blood Press Res*. 2018;43(5):1425-1436.

Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*. 2002 Jul;14(7):1605-19.

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004 Jan 2;303(5654):95-8.

Ma X, Lu C, Lv C, Wu C, Wang Q. The Expression of miR-192 and Its Significance in Diabetic Nephropathy Patients with Different Urine Albumin Creatinine Ratio. *J Diabetes Res*. 2016;2016:6789402.

Mansour SG, Zhang WR, Moledina DG, Coca SG, Jia Y, Thiessen-Philbrook H, McArthur E, Inoue K, Koyner JL, Shlipak MG, Wilson FP, Garg AX, Ishibe S, Parikh CR; TRIBE-AKI Consortium. The Association of Angiogenesis Markers With Acute Kidney Injury and Mortality After Cardiac Surgery. *Am J Kidney Dis*. 2019 Jul;74(1):36-46.

Mladinov D, Liu Y, Mattson DL, Liang M. MicroRNAs contribute to the maintenance of cell-type-specific physiological characteristics: miR-192 targets Na⁺/K⁺-ATPase β 1. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(2):1273-83.

Muralidharan J, Ramezani A, Hubal M, Knoblach S, Shrivastav S, Karandish S, Scott R, Maxwell N, Ozturk S, Beddhu S, Kopp JB, Raj DS. Extracellular microRNA signature in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017 Jun 1;312(6):F982-F991.

Nassirpour R, Ramaiah SK, Whiteley LO. Nephron segment specific microRNA biomarkers of pre-clinical drug-induced renal toxicity: Opportunities and challenges. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016 Dec 1;312:34-41.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86-9.

Peng H, Li Y, Wang C, Zhang J, Chen Y, Chen W, Cao J, Wang Y, Hu Z, Lou T. ROCK1 Induces Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Glomeruli to Aggravate Albuminuria in Diabetic Nephropathy. *Sci Rep*. 2016 Feb 4;6:20304.

Pengcheng S, Ziqi W, Luyao Y, Xiangwei Z, Liang L, Yuwei L, Lechen L, Wanhai X. MicroRNA-497 suppresses renal cell carcinoma by targeting VEGFR-2 in ACHN cells. *Biosci Rep*. 2017 May 19;37(3):BSR20170270.

Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene*. 2010 Apr 15;29(15):2161-4.

Pinzón N, Li B, Martinez L, Sergeeva A, Presumey J, Apparailly F, Seitz H. microRNA target prediction programs predict many false positives. *Genome Res*. 2017 Feb;27(2):234-245.

Portius D, Sobolewski C, Foti M. MicroRNAs-Dependent Regulation of PPARs in Metabolic Diseases and Cancers. *PPAR Res*. 2017;2017:7058424.

Putta S, Lanting L, Sun G, Lawson G, Kato M, Natarajan R. Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Mar;23(3):458-69.

Ranganathan P, Jayakumar C, Tang Y, Park KM, Teoh JP, Su H, Li J, Kim IM, Ramesh G. MicroRNA-150 deletion in mice protects kidney from myocardial infarction-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Sep 15;309(6):F551-8.

Rat Genome Database Web Site, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin. World Wide Web (URL: <http://rgd.mcw.edu/>). RGSC v6.0.

Recio C, Lazaro I, Oguiza A, Lopez-Sanz L, Bernal S, Blanco J, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressor of Cytokine Signaling-1 Peptidomimetic Limits Progression of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Feb;28(2):575-585.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.

Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett*. 2009 Nov 28;285(2):116-26.

Sakabe M, Sakata H, Matsui H, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. ROCK1 expression is regulated by TGFbeta3 and ALK2 during valvuloseptal endocardial cushion formation. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008 Jul;291(7):845-57.

Schäfer M, Ciaudo C. Prediction of the miRNA interactome - Established methods and upcoming perspectives. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Mar 5;18:548-557.

Schmidt RF, Lang F: *Physiologie des Menschen*. 30. Auflage. Springer-Verlag.

Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee WL, Smith WA, Solomon B, Sahota G, Sim J, Mukasa R, Cemerski S, Hatton RD, Stormo GD, Weaver CT, Russell JH, Murphy TL, Murphy KM. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature*. 2009 Jul 16;460(7253):405-9.

Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR, Wendt N, Huber M, Kreutz R. Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Frömter rat. *Physiol Genomics*. 2008 Sep 17;35(1):30-5.

Schulz A, Kreutz R. Mapping genetic determinants of kidney damage in rat models. *Hypertens Res*. 2012 Jul;35(7):675-94.

Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic dissection of increased urinary albumin excretion in the munich wistar frömter rat. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Nov;13(11):2706-14.

Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hänsch J, Wendt N, Kossmehl P, Grimm D, Vetter R, Kreutz R. Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Feb;114(4):305-11.

Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M, Kreutz R. A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):3081-9.

Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hänsch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard JR, Kreutz R. Development of overt proteinuria in the Munich Wistar Frömter rat is suppressed by replacement of chromosome 6 in a consomic rat strain. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jan;18(1):113-21.

Schulz A, Müller NV, van de Lest NA, Eisenreich A, Schmidbauer M, Barysenka A, Purfürst B, Sporbert A, Lorenzen T, Meyer AM, Herlan L, Witten A, Rühle F, Zhou W, de Heer E, Scharpfenecker M, Panáková D, Stoll M, Kreutz R. Analysis of the genomic architecture of a complex trait locus in hypertensive rat models links *Tmem63c* to kidney damage. *Elife*. 2019 Mar 22;8:e42068.

Sequeira-Lopez ML, Weatherford ET, Borges GR, Monteagudo MC, Pentz ES, Harfe BD, Carretero O, Sigmund CD, Gomez RA. The microRNA-processing enzyme dicer maintains juxtaglomerular cells. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Mar;21(3):460-7.

Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006 Jun;69(12):2131-47.

Shi S, Yu L, Chiu C, Sun Y, Chen J, Khitrov G, Merckenschlager M, Holzman LB, Zhang W, Mundel P, Bottinger EP. Podocyte-selective deletion of dicer induces proteinuria and glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;19(11):2159-69.

Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol*. 2011;3(3):83-92.

Sun Y, Koo S, White N, Peralta E, Esau C, Dean NM, Perera RJ. Development of a microarray to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res*. 2004 Dec 22;32(22):e188.

Szeto CC, Li PK. MicroRNAs in IgA nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2014 May;10(5):249-56.

Szeto CC, Wang G, Ng JK, Kwan BC, Mac-Moune Lai F, Chow KM, Luk CC, Lai KB, Li PK. Urinary miRNA profile for the diagnosis of IgA nephropathy. *BMC Nephrol*. 2019 Mar 4;20(1):77.

Tang Y, Wang Y, Park KM, Hu Q, Teoh JP, Broskova Z, Ranganathan P, Jayakumar C, Li J, Su H, Tang Y, Ramesh G, Kim IM. MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death. *Cardiovasc Res*. 2015 Jun 1;106(3):387-97.

Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, McAlister F, Garg AX. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jul;17(7):2034-47.

Trionfini P, Benigni A. MicroRNAs as Master Regulators of Glomerular Function in Health and Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Jun;28(6):1686-1696.

Wei J, Zhang Y, Luo Y, Wang Z, Bi S, Song D, Dai Y, Wang T, Qiu L, Wen L, Yuan L, Yang JY. Aldose reductase regulates miR-200a-3p/141-3p to coordinate Keap1-Nrf2, Tgf β 1/2, and Zeb1/2 signaling in renal mesangial cells and the renal cortex of diabetic mice. *Free Radic Biol Med*. 2014 Feb;67:91-102.

Wei Q, Bhatt K, He HZ, Mi QS, Haase VH, Dong Z. Targeted deletion of Dicer from proximal tubules protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2010 May;21(5):756-61.

Wei SY, Wang YX, Zhang QF, Zhao SL, Diao TT, Li JS, Qi WR, He YX, Guo XY, Zhang MZ, Chen JY, Wang XT, Wei QJ, Wang Y, Li B. Multiple Mechanisms are Involved in Salt-Sensitive Hypertension-Induced Renal Injury and Interstitial Fibrosis. *Sci Rep*. 2017 Apr 6;7:45952.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):855-62.

Xie T, Liang J, Guo R, Liu N, Noble PW, Jiang D. Comprehensive microRNA analysis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis identifies multiple sites of molecular regulation. *Physiol Genomics*. 2011 May 13;43(9):479-87.

- Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev.* 2009 Sep 15;23(18):2166-78.
- Xie Y, Jia Y, Cuihua X, Hu F, Xue M, Xue Y. Urinary Exosomal MicroRNA Profiling in Incipient Type 2 Diabetic Kidney Disease. *J Diabetes Res.* 2017;2017:6978984.
- Xiong M, Jiang L, Zhou Y, Qiu W, Fang L, Tan R, Wen P, Yang J. The miR-200 family regulates TGF- β 1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Feb 1;302(3):F369-79.
- Yamaguchi N, Osaki M, Onuma K, Yumioka T, Iwamoto H, Sejima T, Kugoh H, Takenaka A, Okada F. Identification of MicroRNAs Involved in Resistance to Sunitinib in Renal Cell Carcinoma Cells. *Anticancer Res.* 2017 Jun;37(6):2985-2992.
- Yang C, Wang C, Chen X, Chen S, Zhang Y, Zhi F, Wang J, Li L, Zhou X, Li N, Pan H, Zhang J, Zen K, Zhang CY, Zhang C. Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas. *Int J Cancer.* 2013 Jan 1;132(1):116-27.
- Yang G, Xiong G, Cao Z, Zheng S, You L, Zhang T, Zhao Y. miR-497 expression, function and clinical application in cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):55900-55911.
- Zhang L, Han C, Ye F, He Y, Jin Y, Wang T, Wu Y, Jiang Y, Zhang F, Jin X. Plasma Gelsolin Induced Glomerular Fibrosis via the TGF- β 1/Smads Signal Transduction Pathway in IgA Nephropathy. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 12;18(2):390.
- Zhao WY, Wang Y, An ZJ, Shi CG, Zhu GA, Wang B, Lu MY, Pan CK, Chen P. Downregulation of miR-497 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting HDGF in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jun 7;435(3):466-71.
- Zhao JJ, Chen PJ, Duan RQ, Li KJ, Wang YZ, Li Y. miR-630 functions as a tumor oncogene in renal cell carcinoma. *Arch Med Sci.* 2016 Jun 1;12(3):473-8.

Zhao X, Zhao Z, Xu W, Hou J, Du X. Down-regulation of miR-497 is associated with poor prognosis in renal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Jan 1;8(1):758-64.

Zhou D, Fu H, Zhang L, Zhang K, Min Y, Xiao L, Lin L, Bastacky SI, Liu Y. Tubule-Derived Wnts Are Required for Fibroblast Activation and Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Aug;28(8):2322-2336.

Zhou H, Hasni SA, Perez P, Tandon M, Jang SI, Zheng C, Kopp JB, Austin H 3rd, Balow JE, Alevizos I, Illei GG. miR-150 promotes renal fibrosis in lupus nephritis by downregulating SOCS1. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Jun;24(7):1073-87.

Zhou P, Chen Z, Zou Y, Wan X. Roles of Non-Coding RNAs in Acute Kidney Injury. *Kidney Blood Press Res*. 2016;41(6):757-769.

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johannes Fredrich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Analyse glomerulärer microRNA bei der MWF-Ratte – einem genetischen Tiermodell für chronische Nierenerkrankungen mit Albuminurie“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum 17.02.2022

Unterschrift

7. Lebenslauf

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

8. Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Prof. Reinhold Kreutz für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit zur Promotion, für seine Unterstützung und Geduld. Prof. Kreutz hat mir ermöglicht einen Einblick in die Gestaltung und Führung wissenschaftlicher Arbeitsgruppen zu erhalten. Dafür gilt ihm ebenfalls mein Dank.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Angela Schulz, die mir während des gesamten Prozesses stets eine große Hilfe war. Sie war immer zur Stelle, wenn es galt Probleme zu lösen oder anregende Diskussionen zu führen. Durch ihre außergewöhnliche Struktur und Organisation war es jederzeit möglich auch nach längeren Pausen wieder Anschluss an das Thema zu finden.

Herzlichen Dank gilt auch den beiden wundervollen Medizintechnischen Assistentinnen Claudia Plum und Sabine Wunderlich, die mich an die Laborarbeit herangeführt haben und bei Schwierigkeiten stets zur Stelle waren.

Großer Dank gilt ebenfalls meiner Familie, die mich über die vielen Jahre hinweg immer unterstützt hat und nie daran gezweifelt hat, dass diese Arbeit fertiggestellt werden wird.