

# **Charakterisierung von Rattenmodellen für Nierenerkrankungen mit Fokus auf miRNAs im Urin als Biomarker für Nierenschäden**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Barbara Johanna Petzuch  
aus Friedberg (Bayern)

Düsseldorf, Oktober 2022

aus dem Institut für Toxikologie der Bayer AG Wuppertal  
und dem Institut für Toxikologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Fritz, Gerhard (Institut für Toxikologie, Düsseldorf)
2. Prof. Dr. Schmuck, Gabriele Maria (Bayer AG, Wuppertal)

Betreuer:

Dr. Ellinger-Ziegelbauer, Heidrun (Bayer AG, Wuppertal)

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2022



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 Funktion und Pathogenese der Niere .....	- 1 -
1.2 Präklinische Tiermodelle zur Erforschung von Stoffwechsel-erkrankungen, Bluthochdruck und Nierentoxinen .....	- 5 -
1.2.1 Diabetes, das metabolische Syndrom und das ZSF1-Rattenmodell.....	- 5 -
1.2.2 Essentieller Bluthochdruck und das Renin-transgene Rattenmodell .....	- 8 -
1.2.3 Nephrotoxine und deren präklinische Testung.....	- 10 -
1.3 Klassische und neuere Proteinbiomarker für Nierenschäden.....	- 11 -
1.4 microRNAs, extrazelluläre Vesikel und ihre Relevanz als potenzielle neue Biomarker für Nierenschäden .....	- 13 -
1.4.1 Biogenese und Funktion von microRNAs und extrazellulären Vesikeln.....	- 14 -
1.4.2 microRNAs im Urin als potenzielle Biomarker für Nierenschäden .....	- 16 -
1.4.3 Herausforderung bei der Identifikation von EV microRNA Biomarkern.....	- 18 -
1.5 Ziele dieser Dissertation .....	- 21 -
<b>2. Material</b> .....	<b>- 23 -</b>
2.1 Reagenzien und Chemikalien .....	- 23 -
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	- 24 -
2.3 Kits und Mikroarrays .....	- 25 -
2.4 Puffer und Lösungen.....	- 25 -
2.5 qRT-PCR Assays und Oligonukleotide .....	- 26 -
2.6 Versuchstiere und humane Zellen .....	- 26 -
2.7 Geräte .....	- 27 -
2.8 Software und Webapplikationen .....	- 28 -
<b>3. Methoden</b> .....	<b>- 29 -</b>
3.1 <i>in vivo</i> Studien.....	- 29 -
3.1.1 Metabolisches Syndrom-induzierte Nierenschäden in ZSF1-Ratten .....	- 29 -
3.1.2 Bluthochdruck-induzierte Nierenschäden in TGR(mRen2)27-Ratten .....	- 30 -
3.1.3 Urin- und Gewebeaufarbeitung .....	- 31 -
3.1.4 Histopathologie .....	- 31 -

3.1.5 Klinische Chemie und Proteinbiomarkern Messung im Urin.....	- 32 -
3.2 <i>in vitro</i> -Studien.....	- 32 -
3.2.1 Transformation und Lagerung von hRPTECs.....	- 33 -
3.2.2 Auftauen, Passagieren und Kultivieren von hRPTEC/SV40.....	- 33 -
3.2.3 Behandlung von hRPTECs mit TGF- $\beta$ 1 und HSA.....	- 34 -
3.2.4 Bestimmung der Zytotoxizität.....	- 34 -
3.3 Exosomen-Isolation und Quantifizierung.....	- 35 -
3.3.1 Einengen von Zellkulturmedium und Urin mittels Ultrafiltration.....	- 35 -
3.3.2 Isolation von Exosomen mit dem miRCURY <sup>®</sup> Exosome Isolation Kit.....	- 35 -
3.3.3 Isolation von Exosomen durch Größenausschlusschromatographie.....	- 36 -
3.3.4 Semi-Quantifizierung und Charakterisierung mittels Western Blot.....	- 36 -
3.4 RNA-Isolation, Quantifizierung und Qualitätskontrolle.....	- 37 -
3.4.1 RNA Isolation aus Gewebehomogenat.....	- 38 -
3.4.2 Isolation von Gesamt-RNA inklusive miRNA aus Gewebehomogenat.....	- 39 -
3.4.3 Isolation von RNA aus Zelllysat mit dem RNeasy Kit.....	- 40 -
3.4.4 Isolation von Gesamt-RNA inklusive miRNA aus Zelllysat.....	- 40 -
3.4.5 Isolation von Gesamt-RNA inklusive miRNA aus Gesamturin, Zellkulturmedium oder Exosomen.....	- 41 -
3.4.6 Bestimmung von RNA Konzentration, Reinheit und Integrität.....	- 42 -
3.5 Quantitative qRT-PCR.....	- 42 -
3.5.1 Reverse Transkription und Taqman <sup>®</sup> -basierte qRT-PCR von mRNA.....	- 43 -
3.5.2 LNA <sup>™</sup> -Technologie basierte reverse Transkription und SYBR <sup>®</sup> -Green basierte qRT-PCR von miRNA.....	- 44 -
3.5.3 Auswertung der qRT-PCR.....	- 46 -
3.6 miRNA-Quantifizierung im Gewebe mithilfe der Nanostring <sup>®</sup> -Plattform.....	- 49 -
3.7 Funktionelle Annotation von miRNAs und Ziel-mRNA Vorhersage.....	- 49 -
3.8 Mikroarray-basierte Genexpressionsanalysen.....	- 50 -
3.8.1 Bestimmung der Genexpression in Gewebehomogenaten mittels Mikroarrays..	- 50 -
3.8.2 Qualitätskontrolle und Prozessierung der Genexpressionsdaten mittels Genedata-	54 -
3.8.3 Statistische Analyse und Darstellung der Genexpressionsdaten.....	- 55 -
3.8.4 Interpretation der Genexpressionsprofile.....	- 57 -
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>- 59 -</b>
4.1 Histopathologische Analyse und klinisch-chemische Untersuchung.....	- 59 -

4.1.1 Histopathologische Untersuchungen von Niere und Leber in ZSF1-Ratten .....	- 59 -
4.1.2 Histopathologische Untersuchungen von Niere und Herz in mRenTG-Ratten ....	- 61 -
4.1.3 Klassische und neuere Urin-Biomarker für Nierenschädigung .....	- 62 -
4.2 Genexpressionsanalysen von Niere, Herz und Leber im ZSF1- und mRenTG-Rattenmodell .....	- 65 -
4.2.1 Herz .....	- 67 -
4.2.2 Leber .....	- 70 -
4.2.3 Niere .....	- 75 -
4.3 MicroRNA-Quantifizierung im Urin von ZSF1- und mRenTG-Ratten und in einem <i>in vitro</i> -Modell für renale Fibrose .....	- 85 -
4.3.1 MicroRNA-Profil in Urin und Niere von ZSF1-Ratten .....	- 85 -
4.3.2 MicroRNA-Profil in Urin von mRenTG-Ratten .....	- 94 -
4.3.3 Annotation signifikant veränderter miRNAs im Urin von ZSF- und mRenTG-Ratten .....	- 96 -
4.3.4 Vergleich der microRNA-Profile im Urin von ZSF1-Ratten mit einem Rattenmodell für Glomerulonephritis .....	- 102 -
4.3.5 MicroRNA-Profil in einem <i>in vitro-Modell</i> für renale Fibrose und Albuminurie ...	- 104 -
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>- 109 -</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>- 136 -</b>
<b>Summary</b> .....	<b>- 137 -</b>
<b>Graphical Abstract</b> .....	<b>- 138 -</b>
<b>Limitationen und Ausblick</b> .....	<b>- 139 -</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>VI</b>
<b>Eidesstaatliche Erklärung</b> .....	<b>XXV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XXVI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XXVII</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>XXIX</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>XLVIII</b>
Abbildungen .....	XLVIII
Tabellen .....	LIV

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
(q)PCR	Englisch: ( <i>Quantitative</i> ) <i>real time polymerase chain reaction</i> (deutsch: (Quantitative) Real-time Polymerase-Kettenreaktion)
µl	Mikroliter
AA	Aristolochiasäure
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
Agt	Angiotensinogen
AKI	Englisch: <i>Acute Kidney Injury</i> (deutsch: Akute Nierenschädigung)
ANOVA	Englisch: <i>Analysis of variance</i> (deutsch: Varianzanalyse)
Apln	Apelin
aRNA	amplifizierte RNA
BCA	Bicinchoninsäure
BM	Biomarker
Capto	Captopril
CCM	Englisch: <i>Cell conditioned medium</i> (deutsch: Zell-konditioniertes Medium)
cDNA	Englisch: <i>Copy DNA</i>
CKD	Englisch: <i>Chronic Kidney Disease</i> (deutsch: Chronische Nierenerkrankung)
CKI	Englisch: <i>Chronic Kidney Injury</i> (deutsch: Chronische Nierenschädigung)
CLU	Clusterin
cm	Zentimeter
CNX	Calnexin
COL1A1	Kollagen 1a1
cRNA	komplementäre RNA
Ct	Englisch: <i>Cycle threshold</i>
CYP	Cytochrom-P450-Enzym
CYSC	Cystein C
DN	Diabetische Nephropathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco
dUTP	2'-Desoxyuridin, 5'-Triphosphat
Edn1	Endothelin-1
EGS	Englisch: <i>Eigengene score</i>
ELISA	Englisch: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EV	Extrazelluläres Vesikel (Plural: EVs)
EZM	Extrazelluläre Matrix
f	Fettleibig
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FDR	Englisch: <i>False discovery rate</i>
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
fmol	Femtomol
Fr	Fraktion
FS	Fettsäure

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	glomerulären Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Ghrl	Ghrelin
Glom.	Glomeruli
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HD	Hohe Dosis
HDL	Englisch: <i>High-density lipoprotein</i> (Deutsch: Lipoprotein hoher Dichte)
hDN	Humane diabetische Nephropathie
HESI	Englisch: <i>Health and Environmental Sciences Institute</i>
HK	Hauptkomponente(n)
HKA	Hauptkomponentenanalyse
hRPTEC	Humane renale proximale Tubulusepithelzelle (Plural: hRPTECs)
HSA	Humanes Serumalbumin
IL6	Interleukin 6
Insig	Insulin-induziertes Gene
Insr	Insulinrezeptor
IPA	Englisch: <i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IVT	<i>In vitro</i> -Transkription
kDA	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KIM-1	Englisch: <i>Kidney injury molecule 1</i>
Kon	Kontrolle
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Englisch: Low-density lipoprotein (deutsch: Lipoprotein geringer Dichte)
L-NAME	N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester
MD	Mittlere Dosis
MetS	Metabolisches Syndrom
min	Minute(n)
Min.	Minimale
miRISC	Englisch: <i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRenTG	Maus Renin2-transgene Ratten
mRenTG-Ratten	Maus Renin-2 transgene Ratten
mRNA	Englisch: Messenger RNA
Mtpn	Myotrophin
MV	Mikrovesikel
ND	Niedrige Dosis
NGAL	Neutrophilengelatase-assoziierte Lipocalin
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NTS	Nephrotoxisches Serum
OPN	Osteopontin
OvL	Englisch: <i>Obese vs lean</i> (Deutsch: Fettleibig verglichen zu schlanker Kontrolle)
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PBS	Englisch: <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (deutsch: phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
Ppar	Peroxisomen Proliferator Aktivierte

qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin II-Aldosteron-System
RIN	Englisch: <i>RNA Integrity Number</i>
RISC	Englisch: <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Englisch: <i>Reactive oxygen species</i> (deutsch: Reaktive Sauerstoffspezies)
s	Schlank
sAKI	Englisch: <i>Sub-acute Kidney Injury</i> (deutsch: Sub-akute Nierenschädigung)
sCKI	Englisch: <i>Sub-chronic Kidney Injury</i> (deutsch: Sub-chronische Nierenschädigung)
SD-Ratten	Sprague-Dawley-Ratten
sec	Sekunde(n)
SEC	Englisch: <i>Size exclusion chromatography</i> (deutsch: <i>Größenausschlusschromatographie</i> )
SHHF-Ratten	Englisch: <i>Spontaneously hypertensive HF prone rats</i>
SREBF	Englisch: <i>Sterol regulatory element-binding transcription factor</i>
SREBP	Englisch: <i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
Stc1	Stanniocalcin-1
SV40	Simianes Virus 40
TGF- $\beta$	Englisch: <i>Tumor growth factor beta</i>
TNF	Tumor Nekrose-Faktor alpha
TXG-MAPr	Englisch: <i>Toxicogenomic module associations with pathogenesis</i>
UCrea	Kreatinin(gehalt) im Urin
upm	Umdrehungen pro Minute
UPR	Englisch: <i>Unfolded protein response</i> (deutsch: ungefaltete Protein-Antwort)
VIM	Vimentin
W	Woche
WGCNA	Englisch: <i>Weighted gene co-expression network analysis</i> (deutsch: Analyse des gewichteten Korrelationsnetzwerks)
WKY-Ratte	Wistar Kyoto-Ratte
ZDF-Ratten	Englisch: <i>Zucker diabetic fatty rats</i>
$\Delta\Delta Ct$	Delta delta Ct

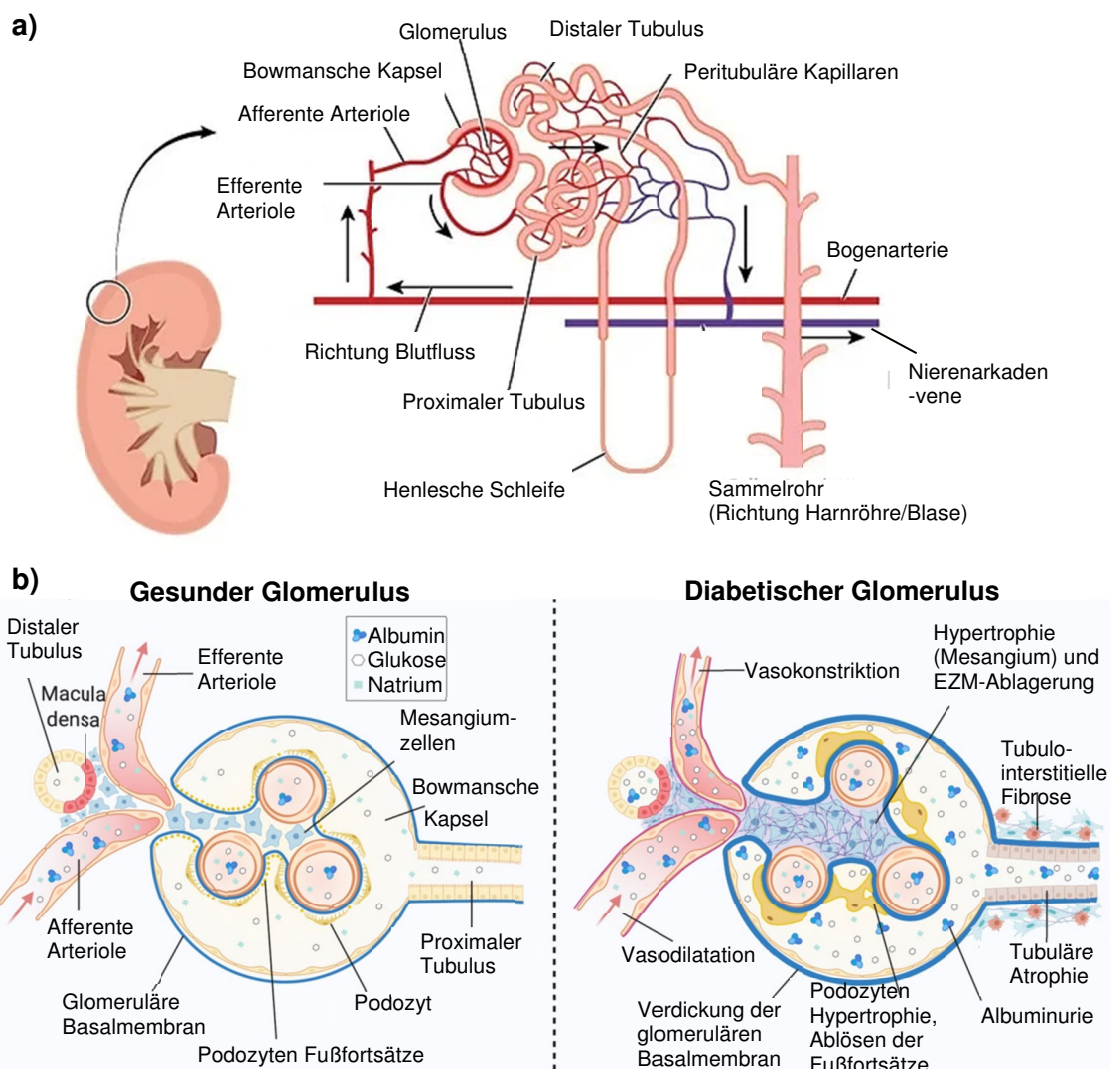
# 1. Einleitung

## 1.1 Funktion und Pathogenese der Niere

Bereits 3500 bis 3000 vor Christus waren Wörter für Niere und Urin Teil des sumerischen Wortschatzes, doch sehr lange Zeit war die zentrale Stellung und Funktion der Niere im Organismus unbekannt. Erst ab dem 16. Jahrhundert, unter anderem durch die anatomischen Untersuchungen von Leonardo da Vinci (1452 – 1519), Michelangelo (1475 – 1564) und Bartolomeo Eustachio (1524 – 1574), begann man das Organ langsam zu verstehen (da Vinci 1515-1516; Eknoyan 2000; Purkerson und Wechsler 1997). Die heute bekannteste Funktion der Niere ist die Ausscheidung von schädlichen und überflüssigen Abfallprodukten des Stoffwechsels, Medikamenten und Giften über den Urin (Nigam et al. 2015). Aber die Niere spielt auch eine zentrale Rolle in der Homöostase des Organismus. Zum einem wird der Wasser- Nährstoff-, Spurenelement- und Mineralstoffhaushalt des Körpers durch Steuerung der Ausscheidung über den Urin reguliert (Curthoys und Moe 2014). Zum anderen nimmt die Niere eine wichtige Stelle als Regulator des Säure-Base-Haushaltes und des Blutdrucks sowie der hormonellen Aktivität (Renin, Erythropoetin und Calcitriol) ein und ist neben der Leber der zweitwichtigste Ort des Stoffwechsels von endogenen und exogenen Molekülen (Hamm et al. 2015; Kurt und Kurtz 2015).

Anatomisch gesehen ist das Nierengewebe in kleine funktionelle Einheiten gegliedert, die sogenannten Nephrone (Abbildung 1). Ein Nephron beginnt mit einem Glomerulus, der Filtrationseinheit der Niere. Er ist aufgebaut aus Kapillarschlingen mit fenestrierten Endothel, welche der Nierenarterie entspringen, einer glomerulären Basalmembran (GBM), Podozyten und dem Mesangium und wird von der Bowmanschen Kapsel umgeben (Salmon et al. 2009). Bestandteile des Blutes mit einer geringen negativen Gesamtladung und einem Durchmesser von maximal sechs bis acht Nanometer wie Wasser, Ionen oder kleine Moleküle werden in diesen Strukturen filtriert (Du et al. 2017). Das resultierende Ultrafiltrat, auch Primärharn genannt, durchläuft anschließend ein renales Tubulussystem bestehend aus dem proximalem Tubulus, Henlesche Schleife und dem distalem Tubulus. In diesen Bereichen werden kleine Moleküle, Elektrolyte und Wasser über spezialisierte Transportproteine aus dem Primärharn rückresorbiert und in dem Körperkreislauf zurückgeführt. Umgekehrt können auch Bestandteile des Blutes über Transportproteine in den Tubuluszellen in den Urin transportiert und dadurch ausgeschieden werden (Curthoys und Moe 2014). Die Regulation dieser Transportprozesse hängt dabei von den Bedürfnissen des

Organismus ab. So kann zum Beispiel durch gezielte Steuerung der Sekretion und Rückresorption von Wasser und Natriumionen in der Niere der Natriumgehalt des Blutes und der damit zusammenhängende systemische Blutdruck reguliert werden (Guyton und Coleman 1999; Guyton et al. 1972). Ein weiteres Beispiel ist Glukose, welche bei erhöhtem Energiebedarf und geringen Reserven des Organismus verstärkt rückresorbiert wird, oder in der Niere über die Glukoneogenese neu gebildet werden kann, während Glukose bei einem Überschuss vermehrt über den Urin ausgeschieden wird (Triplitt 2012). Der distale Tubulus führt anschließend in das Sammelrohr. Dort folgt eine vermehrte Resorption von Wasser, Natrium und Chlorid und somit endgültige Konzentration des Urins, welcher im Folgenden über die Blase und den Harnleiter aus dem Körper ausgeschieden wird.



**ABBILDUNG 1: ÜBERSICHT ÜBER DIE NIERENFUNKTION (THOMAS 2019) UND -PATHOGENESE, EXEMPLARISCH DARGESTELLT ALS DIABETISCHE NIERENSCHÄDIGUNG (NICHOLSON ET AL. 2021). ENGLISCHE BESCHRIFTUNG WURDE IM RAHMEN DIESER ARBEIT INS DEUTSCHE ÜBERSETZT.**



Die Funktion der Niere als Filtrationsorgan des Organismus und die dadurch notwendige gute Durchblutung des Organs hat unter anderem zur Folge, dass das Gewebe im hohen Maße gegenüber toxischen Konzentrationen körpereigener und körperfremder Substanzen exponiert ist. Zusätzlich kann die Rückresorption durch die Tubuluszellen zur Konzentration und Anreicherung von Stoffwechselprodukten, Chemikalien und Medikamenten bis hin zu lokal toxischen Konzentrationen führen. Auch kann der tubuläre Fremdstoffmetabolismus gegebenenfalls zur Toxifizierung führen und dadurch das Schädigungspotential der Verbindungen weiter erhöhen. Mechanische Faktoren wie erhöhter Druck in den Kapillarschlingen des Glomerulus in Folge von Bluthochdruck können die Gefäße und die glomerulären Zellen ebenfalls schädigen und somit die Filterfunktion des Glomerulus negativ beeinflussen (Khan und Khan 2015; Matovinović 2009; Radi 2019).

Kommt es zur Exposition der Niere gegenüber schädlichen Faktoren oder Substanzen gibt es mehrere molekularbiologische Mechanismen und Prozesse, die zur renalen Schädigung beitragen oder ihr entgegenwirken können. Zu diesen gehört zum Beispiel die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Während physiologische Konzentrationen verschiedener ROS unter anderem Zellproliferation und Entzündungsprozesse regulieren, führen pathologische Konzentrationserhöhungen zu oxidativem Stress, welcher unter anderem zu DNA-Schäden führen kann (Schieber und Chandel 2014). Mit oxidativem Stress kann eine Entzündung der Niere zusammenhängen. Bei Entzündungsprozessen kommt es zu einer Infiltration von Immunzellen in die Niere, um geschädigte Zellen zu entfernen. Bei andauernder Inflammation hingegen kann es zur Schädigung der Niere durch anhaltenden oxidativen Stress kommen (Libetta et al. 2011; Qian 2017). Eine häufige Art der entzündlichen Nierenschädigung ist die Glomerulonephritis, bei der es zur Entzündung des Glomerulus und in manchen Fällen zu einer Proliferation der Mesangialzellen, Ablösung von Podozyten und zur Verdickung der GBM kommt. Dies führt zu einer Reduktion der Filtrationsleistung des betroffenen Glomerulus (Kawasaki 2011; Lemley 2016). Ein weiterer protektiver aber auch potenziell schädlicher Mechanismus der Niere ist die Differenzierung von Endothel- und Epithelzellen zu Fibroblasten, ein Prozess der auch Endotheliale- oder Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) genannt wird, und beinhaltet die Aktivierung von Fibroblasten und die durch aktivierte Fibroblasten vermittelte Synthese neuer extrazellulären Matrix (EZM) (Lovisa et al. 2016). Ein zentraler Regulator, der die Differenzierung und Aktivierung von Fibroblasten sowie die Produktion der EZM stimuliert, ist unter anderem der „*Tumor growth factor  $\beta$* “ (TGF- $\beta$ ) (Frangogiannis 2020). Die erhöhte EZM Produktion kann auf der einen Seite die Wiederherstellung des Nierengewebes unterstützen, bei exzessiver

EZM Produktion im Rahmen der sogenannten Fibrose kann dies allerdings dazu führen, dass für die Nierenfunktion essentielle Nierenzellen durch Bindegewebe ersetzt werden und damit die Nierenfunktion beeinträchtigt wird (Lovisa et al. 2016). Alle genannten pathophysiologischen Prozesse können über einen längeren Zeitraum dazu führen, dass ganze Nephrone untergehen und die Filtrationsfunktion der Niere negativ und oft irreversibel beeinträchtigt wird. Unter Umständen führt dies zu einem Nierenversagen im Endstadium, bei dem die Niere den Körper nicht mehr entgiften kann und somit eine Dialyse zur Entgiftung des Körpers und eine Nierentransplantation nötig wird (Shabaka et al. 2021; Zhong et al. 2017).

Welche und wie diese molekularbiologischen Prozesse in der Niere in welcher Reihenfolge ablaufen hängt unter anderem von der Art und der Dauer der Nierenschädigung ab. Unterschiede findet man unter anderem die zwischen akuten (englisch *acute kidney injury* = AKI) und chronischen Nierenschäden (englisch *chronic kidney injury* = CKI). Bei der AKI kommt es innerhalb weniger Stunden zu einem abrupten Abfall der Nierenleistung, wobei sowohl die Gewebestruktur der Niere zum Beispiel durch akutes Sterben der Tubuluszellen geschädigt als auch die Funktion der Niere für maximal sieben Tage eingeschränkt wird (Kellum et al. 2021). Häufige Ursachen von AKI sind unter anderem Exposition gegenüber Umweltfaktoren und Medikamenten mit nephrotoxischem Potential, renale Durchblutungsstörungen und Infektionen (Makris und Spanou 2016). Nach einer AKI kann die Nierenfunktion durch Regeneration des Gewebes wieder hergestellt werden. Hierzu gehören unter anderem das Entfernen geschädigter Zellen durch Immunzellen, die Vergrößerung (Hypertrophie) und Wiederherstellung von Blutgefäßen und Zellen des Nephrons sowie Synthese der EZM durch Fibroblasten. Bei unvollständiger Regeneration nach AKI oder anhaltende Exposition gegenüber nierenschädigenden Faktoren kann diese in eine chronische Nierenschädigung (CKI) übergehen (Kellum et al. 2021). Häufig beobachtete Pathomechanismen der CKI sind teils irreversible glomeruläre Schäden einschließlich Podozytenablösung, glomeruläre Fibrose und Hypertrophie, Funktionsverlust und Zelltod der Tubuluszellen, renalen Fibrose und Entzündung des Nierengewebes (Romagnani et al. 2017). Der Untergang ganzer Nephrone während AKI und CKI führt zur Reduktion der Nierenleistung und zu einer Überlastung der noch funktionstüchtigen Nephrone, wodurch die Progression der Nierenschädigung beschleunigt wird (Kellum et al. 2021). Der Definition nach besteht im Falle einer CKI die funktionelle oder strukturelle Beeinträchtigung über einen Mindestzeitraum von 3 Monaten, wobei im Falle einer funktionellen Beeinträchtigung die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unter 60 ml pro Minute liegt (Matovinović 2009). CKI wird oft im

Zusammenhang mit chronischen Nierenerkrankungen (englisch *chronic kidney disease* = CKD) beobachtet. Einige Hauptursachen für CKD weltweit sind (Luyckx et al. 2017):

- Stoffwechselerkrankungen (z.B. Diabetes, metabolisches Syndrom)
- Herz-Kreislauf-Erkrankungen (z.B. Persistierender Bluthochdruck)
- Längere Exposition gegenüber Nephrotoxinen (z.B. Medikamente, natürliche Toxine, Schwermetalle)
- Infektionen und chronische Entzündungen

CKD im Zusammenhang mit Stoffwechsel- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes und persistierendem Bluthochdruck sind eine der Hauptursachen für die in den letzten Jahrzehnten zunehmenden globalen Erkrankungs- und Sterblichkeitsraten von CKD (Bikbov et al. 2020). Die globale Prävalenz von CKD wird heute auf etwa 13.4% geschätzt und insgesamt benötigen 4,9 bis 7,1 Millionen Patienten aufgrund von Nierenerkrankungen im Endstadium eine Nierentransplantation (Lv und Zhang 2019). CKD stehen damit auf Platz 12 der häufigsten Todesursachen und haben damit einen signifikanten Einfluss auf alle Bereiche des Gesundheitswesens (Bikbov et al. 2020; GBD 2016). Daher konzentrieren sich große Bereiche der Forschung weltweit auf die Erforschung der molekularen Prozesse von CKD in Abhängigkeit von verschiedenen Risikofaktoren und Ursachen, auf die Suche und Etablierung neuer Biomarker für eine frühe Detektion von CKD, auf die Entwicklung neuer Medikamente und auf die frühe Identifikation des nierentoxischen Potentials neuer Pharmaka und Umweltchemikalien.

## **1.2 Präklinische Tiermodelle zur Erforschung von Stoffwechselerkrankungen, Bluthochdruck und Nierentoxinen**

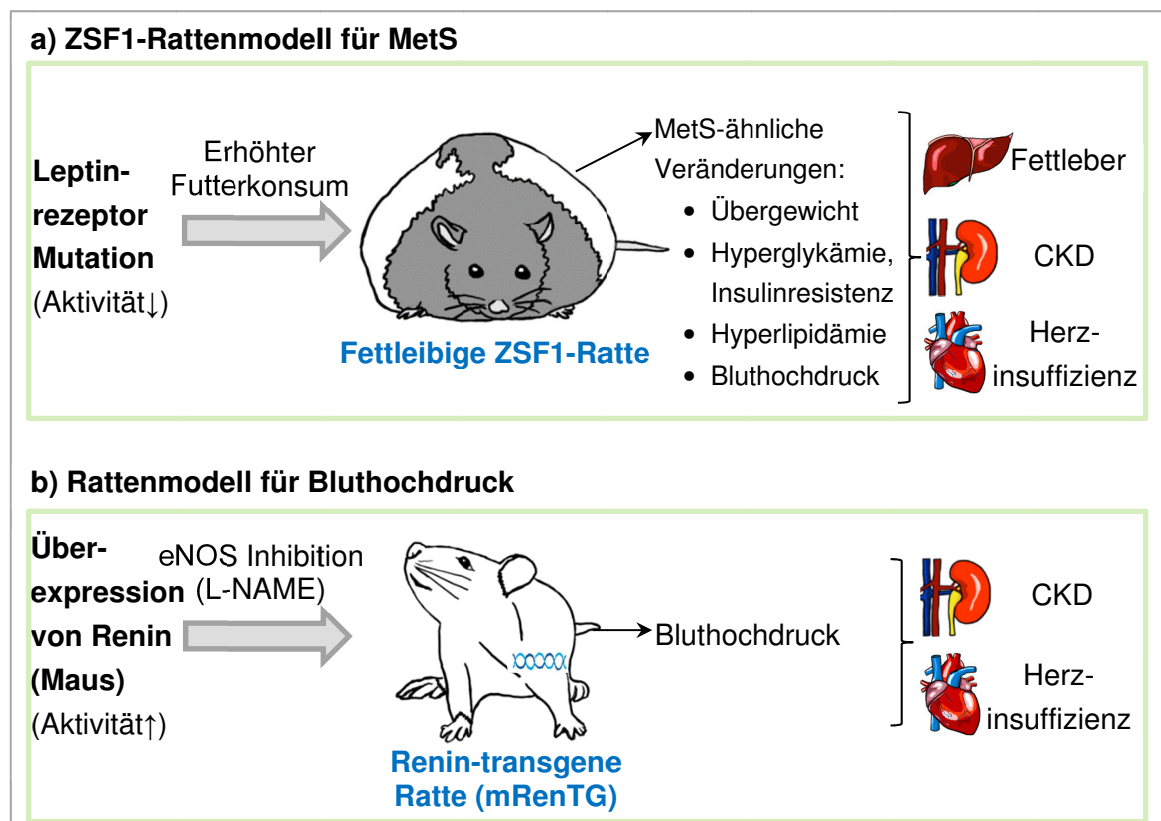
### **1.2.1 Diabetes, das metabolische Syndrom und das ZSF1-Rattenmodell**

Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes und das Metabolische Syndrom (MetS) haben in den letzten Jahrzehnten deutlich an Relevanz im Gesundheitswesen gewonnen. Diabetes mellitus ist ein Überbegriff zur Beschreibung von Krankheiten, bei denen es zu erhöhten Blutzuckerwerten und zu einem Mangel von Insulin (Typ-1-Diabetes) oder einer Desensibilisierung gegenüber der Wirkung von Insulin (Typ-2-Diabetes) kommt (Bundesministerium für Gesundheit 2021). Folge eines langfristigen Typ-2-Diabetes sind unter anderem Schädigungen von Herz und Blutgefäßen, Nephropathie, periphere Neuropathie und diabetische Retinopathie (WHO 2021). 2018 war Diabetes weltweit auf Platz neun und in der USA auf Platz sieben der häufigsten Todesursachen (CDC 2018; Zheng et al. 2018). Die *International Diabetes Federation* sagte 2019 voraus,

dass in den nächsten 26 Jahren die Anzahl der Diabetespatienten um 51% steigen wird (IDF 2019). Liegen neben Diabetes noch weitere Risikofaktoren und Komorbiditäten für kardiovaskuläre Erkrankungen vor, kann sich das MetS entwickeln. Das MetS, auch kardiometabolisches Syndrom oder Syndrom X genannt, wurde das erste Mal durch Reaven 1988 beschrieben, obwohl dessen Existenz bereits seit den 1920er Jahren bekannt ist (Reaven 1988; Sarafidis und Nilsson 2006). Die vier Hauptkriterien, die im Rahmen eines MetS beobachtet werden können, sind Übergewicht, Dyslipidemie (niedriges HDL und/oder erhöhte Triglyzeride), erhöhter Blutdruck sowie Veränderungen des Glukosestoffwechsels (Insulinresistenz oder Diabetes, Hyperglykämie) (Huang 2009). Neben diesen Hauptkriterien gibt es noch weitere Risikofaktoren, welche zur Entstehung des MetS beitragen können. Zu diesen gehören ein erhöhtes Risiko von Thrombosen, oxidativer Stress und chronische Entzündungen (Mendrick et al. 2018). Das Zusammenspiel dieser verschiedenen Faktoren führt zu einem komplexen Krankheitsbild einschließlich CKD, nicht-alkoholischer Lebersteatose, Schlaganfällen, erhöhtem Krebsrisiko, polyzystischem Ovarialsyndrom sowie verschiedener neurologischen Erkrankungen (Mendrick et al. 2018). Man schätzt, dass heute etwa 20 bis 25% aller Erwachsener am MetS erkrankt sind (Belete et al. 2021). Während Typ-1-Diabetes und damit assoziierte Nierenschäden durch genetische Faktoren bestimmt wird, wird der Typ-2-Diabetes und das MetS unter anderem bedingt durch bestimmte ungesunde Ernährungsgewohnheiten und Lebensstil wie zu wenig Bewegung, erhöhtem Alkoholkonsum und Rauchen (Manaf et al. 2021). Die Forschung der letzten Jahre hat allerdings gezeigt, dass auch Pestizide, Medikamente und Metalle wie Dichlordiphenyltrichlorethan, Amphotericin B und Lithium möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für nephrogenen Typ-2-Diabetes, Übergewicht, Bluthochdruck und der Entstehung von MetS assoziiert sind (Harbord 2011; Mendrick et al. 2018).

Die hohe und zunehmende Inzidenz von Diabetes, morbidem Übergewicht und MetS hat zur vermehrten Erforschung dieser Erkrankungen geführt, mit dem Ziel frühe Biomarker für die assoziierte CKD und wirksame Medikamente gegen die CKD zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurden verschiedene präklinische Tiermodelle etabliert. Ein robustes Tiermodell für das MetS mit einer guten Humanrelevanz sind ZSF1-Ratten, welche durch Kreuzung von weiblichen *Zucker diabetic fatty rats* (engl., ZDF-Ratten) und männlichen *spontaneously hypertensive HF prone rats* (engl., SHHF-Ratten) generiert werden. Beide Rattenstämme tragen eine genetische Modifikation des Leptinrezeptors, welche zur Leptinresistenz gefolgt von einer Veränderung des Glucose- und Lipidmetabolismus und einer erhöhten Nahrungsaufnahme und damit verbundenem Übergewicht führt (Sáinz et al. 2015). SHHF-Ratten entwickeln

zusätzlich spontan essentiellen Bluthochdruck mit sekundärer kongestiver Herzinsuffizienz (Heyen et al. 2002). Die Kombination der homozygot vererbten Gene und Mutationen für Leptinresistenz sowie Bluthochdruckes führt zu einem komplexen MetS-ähnlichem Krankheitsbild in den fettleibigen ZSF1-Ratten. Dies umfasst eine Kombination von Bluthochdruck, Übergewicht, abdominale Adipositas, Insulinresistenz, orale Glukoseintoleranz und Hyperlipidämie (Griffin et al. 2007; van Dijk et al. 2016). Diese Faktoren führen in ZSF1-Ratten mit zunehmenden Alter zu Nierenerkrankungen im Endstadium, Schädigung der Blutgefäße und diastolische Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (Stolina et al. 2020).



**ABBILDUNG 2: DAS METABOLISCHE SYNDROM UND ESSENTIELLER BLUTHOCHDRUCK AM BEISPIEL VON ZSF1 UND mRENTG-RATTEN**

L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester. eNOS: Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase. MetS: Metabolisches Syndrom. CKD: Chronische Nierenerkrankung. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten.

Beachtet werden muss bei diesem Modell allerdings, dass die Entwicklung der Nierenschäden zum größten Teil unabhängig vom systemisch erhöhten Blutdruck sind (Griffin et al. 2007). Das ZSF1-Tiermodell eignet sich demnach hauptsächlich zur Erforschung von sekundären Nierenschäden durch Übergewicht, Hyperglykämie und Hyperlipidämie. Für die Erforschung schädlicher Auswirkungen von Bluthochdruck auf die Niere müssen hingegen andere Tiermodelle herangezogen werden. Ein Vorteil des

ZSF1-Modells ist neben der Abbildung des multifaktoriellen Entstehungsprozesses des MetS die Unabhängigkeit der Krankheitsprogression von einer bestimmten Behandlung oder anderweitigen Eingriffen da die Erkrankung genetisch bedingt ist und der genetische Hintergrund konstant ist. Da die Pathogenese und die resultierenden Organschäden dabei zum Teil rein Typ-2-diabetischen Komplikationen ähneln, klassifizierte das *Animal Models of Diabetic Complications Consortium* des *National Institutes of Health* das ZSF1-Rattenmodell für MetS zusätzlich als „ein valides Tiermodell für diabetische Komplikationen“ (Brosius et al. 2009; Dower et al. 2017). Als Kontrolltiere zu den fettleibigen ZSF1-Ratten werden schlanke ZSF1-Ratten verwendet. Diese sind heterozygot für die Leptinrezeptormodifikation und tragen daher noch einen funktionierenden Leptinrezeptor, weshalb sie kein Diabetes und damit assoziierte Komplikationen entwickeln (Hye Khan et al. 2018). Ein Nachteil dieser Kontrolltiere ist, dass sie ebenfalls ein Gen für Bluthochdruck von dem SHHF-Stamm erben und somit ebenfalls Bluthochdruck entwickeln (Leite et al. 2019). Da Bluthochdruck alleine bereits Niere, Gefäße und Herz schädigen kann (Hayakawa et al. 1997), stellt die Kontrollgruppe in diesem Tiermodell keine vollkommen gesunde Vergleichsgruppe dar. Da man allerdings einen möglichst ähnlichen genetischen Hintergrund zwischen fettleibigen ZSF1- und Kontrolltieren haben möchte, wird diese Einschränkung bei dem Tiermodell akzeptiert.

## **1.2.2 Essentieller Bluthochdruck und das Renin-transgene Rattenmodell**

Bluthochdruck ist eine weitere Hauptursache für das hohe Aufkommen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und der damit verbundenen reduzierten Lebenserwartung. Es wird geschätzt, dass 2019 etwa 33 % aller Erwachsener weltweit an Bluthochdruck litten und dass besonders in Ländern mit niedrigem bis mittlerem Einkommen die Prävalenz in den letzten Jahren stark angestiegen ist (NCD Risk Factor Collaboration 2021; Zhou et al. 2021). Nach der *Framingham Heart Study* liegt die Wahrscheinlichkeit eines 55-Jährigen mit normalen Blutdruck im Laufe seines Lebens an Bluthochdruck zu erkranken bei etwa 90% (Vasan et al. 2002). Es gibt zahlreiche Faktoren, die zur Entstehung von Bluthochdruck beitragen können. Diese umfassen neben einer fehlerhaften Ernährung mit natriumreichen und kaliumarmen Lebensmitteln, erhöhter Alkoholkonsum und Übergewicht ebenso fehlende körperliche Betätigung und möglicherweise ebenfalls Exposition gegenüber bestimmten Toxinen wie Quecksilber (Mills et al. 2020; Pamphlett et al. 2021). Die Folgen von dauerhaftem Bluthochdruck sind dabei genauso vielfältig wie die dazu beitragenden Risikofaktoren.

Zum einen besteht ein direkter und deutlicher Zusammenhang mit der Schädigung der Herzmuskulatur sowie der Gefäße, welche in Herzinfarkten und Herzversagen resultieren kann. Zum anderen erhöht Bluthochdruck das Risiko von Schlaganfällen und trägt zur Entstehung sowie Progression von Nierenschäden bei (Lewington et al. 2002; Xie et al. 2016).

Um die Pathogenese der Organschäden aufgrund von essentiellen Bluthochdruck besser zu verstehen und sowohl Biomarker als auch Medikamente für Diagnostik und Behandlung entwickeln zu können, wurden verschiedene präklinische Tiermodelle entwickelt. Ein Rattenmodell für essentiellen Bluthochdruck sind TGR(mREN2)27-Ratten (mRenTG Ratten). Dabei handelt es sich um ein transgenes Rattenmodell basierend auf dem genetischen Hintergrund von Sprague-Dawley (SD)-Ratten, welches ein zusätzliches Renin-2 Gen aus der Maus trägt und in Folge dessen ein höheres Aktivitätslevel des Renin-2 Enzyms hat (Mullins et al. 1990). Dies führt in diesem Tiermodell zur Aktivierung des lokalen und Plasma Renin-Angiotensin II-Aldosteron-Systems (RAAS), die zur Verengung der Blutgefäße und zur Veränderung der Kontraktion des Herzens und des Pulses durch Interaktion mit dem sympathischen Nervensystem führt. Die Folge sind systemischer Bluthochdruck sowie eine Hypertrophie des Herzens (Zobel et al. 2007). Zusätzlich zu der genetischen Komponente können mRenTG-Ratten mit dem Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase-Inhibitor L-NAME behandelt werden (Follmann et al. 2017). Einige molekularbiologische Mechanismen, durch die L-NAME zu Hypertension führt, sind bis heute noch unbekannt. Ein zentraler Bestandteil der Krankheitsentstehung ist allerdings die Inhibierung der NO-Synthase in Endothelzellen (eNOS), was zu einer reduzierten Produktion von NO führt. NO ist ein wichtiger Vermittler der Erweiterung der Blutgefäße. Reduzierte NO Konzentrationen in der Gefäßwand der Blutgefäße führen daher zu einer Kontraktion derselben und in Folge dessen zu einem erhöhten Blutdruck (Li et al. 2015a). Die gemeinsame Wirkung einer erhöhten Reninaktivität sowie einer NO Inhibition führen zu einer Beschleunigung der Krankheitsentwicklung und einem gravierenderen Krankheitsverlauf, welche gekennzeichnet ist durch einen ausgeprägten Bluthochdruck, Nieren- und Herzversagen und einer erhöhten Mortalität (Sharkovska et al. 2010). Als Kontrolltiere werden mRenTG-Ratten verwendet, welche mit dem Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE)-Hemmer Captopril behandelt wurden. Captopril wirkt unter anderem der Aktivierung des RAAS durch die erhöhte Reninaktivität und somit der durch die transgene Reninmodifikation induzierte Pathogenese entgegen und die Kontrolltiere bleiben gesund (Follmann et al. 2017; Hirth-Dietrich et al. 1994).

### 1.2.3 Nephrotoxine und deren präklinische Testung

Es gibt zahlreiche Chemikalien, Verbindungen in Pilzen und Pflanzen und Medikamente mit einem nephrotoxischen Potential, welche je nach Dauer der Exposition sowohl eine AKI als auch eine CKI induzieren können. Ein Beispiel für ein klassisches Nierentoxin ist die Aristolochiasäure (AA), ein Inhaltsstoff aus Pflanzen der Familie der Aristolochiaceae. Die nephrotoxische Wirkung von AA ist zwischen 1990 und 1992 in den Fokus gerückt, nachdem Bestandteile aus Aristolochiaceae als Teil chinesischer Phytopharmaka verschrieben wurden und dabei gravierende Nierenschäden induzierten, was den Begriff der Chinesische Heilkräuter-Nephropathie prägte. Zudem wurde die AA-reiche gewöhnliche Osterluzei als Ursache der sogenannten Balkan-Nephropathie identifiziert, bei der es seit den 1950er Jahren durch Konsum von kontaminiertem Weizen in mehreren baltischen Ländern zu einer langfristigen Exposition gegenüber AA kam und dies mit chronischen Nierenschädigungen assoziiert wurde. Noch heute geht man von einer weltweit hohen Exposition gegenüber AA vor allem in Asien, Indien und Afrika aus, doch genaue epidemiologische Daten gibt es nicht (Gökmen et al. 2013; Luciano und Perazella 2015). Die genauen molekularen Prozesse der AA-Nephropathie sind bis heute noch unzureichend verstanden. Bekannt ist allerdings, dass AA früh eine akute Nekrose der Tubuluszellen induziert, bei der die Regeneration der Tubuluszellen nicht ausreichend erfolgt sondern sich frühzeitig eine schwere tubuläre Dysfunktion und Degeneration, sowie eine interstitielle Nephritis und Fibrose entwickelt (Lebeau et al. 2001; Lebeau et al. 2005; Li et al. 2001). Die Folge ist eine sehr schnell fortschreitende Nephropathie bis hin zur Niereninsuffizienz und Nierenerkrankung im Endstadium. Zudem ist AA genotoxisch und kanzerogen und ist mit der sehr hohen Prävalenz von Urothelkarzinomen von 40 bis 45% assoziiert (Chen et al. 2012a; Nortier et al. 2000). Nierenschädigungen sind auch eine häufige Nebenwirkung von Medikamenten, wobei oft der Glomerulus betroffen ist. Solche Medikamente mit nephrotoxischem Potential sind unter anderem Doxorubicin und Adriamycin. Beide Substanzen induzieren Nierenschäden ähnlich zu einer fokalen segmentalen Glomerulosklerose, bei der es zu einer progressiven Vernarbung der Glomeruli kommt (Khan und Khan 2015). Des Weiteren wurden Etanercept, Hydralazin und Propylthiouracil mit der Entwicklung der sogenannten Pauci-Immun-Glomerulonephritis in Zusammenhang gebracht, bei der es durch Bildung von Antikörper gegen Neutrophile, ein Subtyp der Immunzellen, zur Entstehung einer Glomerulonephritis kommt (Harbord 2011).

Das nierentoxische Potential verschiedener Substanzen und Verbindungen kann in toxikologischen Studien untersucht werden, bei denen in der Regel gesunde Tiere mit



der Substanz über einen definierten Zeitraum behandelt werden. Diesen Ansatz findet man sowohl in der präklinischen Medikamentenentwicklung als auch in der Entwicklung von Chemikalien mit anderen Anwendungsbereichen.

Um im Labor allgemein gültige molekularbiologische Prozesse zu untersuchen, welche mit spezifischen behandlungsinduzierten nierenschädigenden Prozessen assoziiert sind, können Tiere auch mit sogenannten nephrotoxischen „*tool compounds*“ behandelt werden. Das sind Nephrotoxine, welche bekanntermaßen eine bestimmte Art der Nierenschädigung hervorrufen und als Referenzsubstanz verwendet werden können. Ein Tiermodell, welches zum Beispiel zur Erforschung behandlungsinduzierter Glomerulonephritis herangezogen werden kann ist das sogenannte anti-GBM Rattenmodell. Dabei werden Nager mit nephrotoxischem Serum (NTS) als *tool compound* behandelt, welches Antikörper gegen die GBM beinhaltet und dadurch glomeruläre Schäden induziert (Pavkovic et al. 2015b; Pusey 2003). Obwohl Tiermodelle mit glomerulärer Schäden einschließlich Glomerulonephritis schon länger für die Forschung zur Verfügung stehen, sind bis heute zahlreiche molekularbiologischen Prozesse der Pathogenese und auch frühe Biomarker dieser Veränderungen noch nicht ausreichend verstanden und identifiziert worden.

### **1.3 Klassische und neuere Proteinbiomarker für Nierenschäden**

Die Nephrologie gehört seit Beginn der Medizin zu einer ihrer Kerngebiete und ist schon seit den Zeiten von Galenos von Pergamon im 1. bis 2. Jahrhundert nach Christus in Form der sogenannten „Urinschau“ fester Bestandteil medizinischer Untersuchungen (Schulz und Brass 2017). Bereits damals wurden Parameter wie die Farbe und der Geschmack des Urins herangezogen, um auf die Funktion der Niere Rückschlüsse zu ziehen. Seit dieser Zeit wurde intensiv daran geforscht, weitere und sensitivere Biomarker für Nierenschäden zu identifizieren und zu validieren. Biomarker sind objektiv messbare Parameter biologischer Prozesse, welche als Referenz für Prozesse und Krankheitszustände im Körper verwendet werden können. Sie können dabei zur Diagnostik, zur Erstellung von Prognosen oder zur Risikoeinschätzung dienen (Strimbu und Tavel 2010).

Aktuell basiert die Standardmethode zur Diagnose von Nierenerkrankungen und Nephrotoxin-assoziierten Nierenschäden auf verschiedenen Urin-basierten Biomarkern und der Biopsie (Gökmen et al. 2013). Klassische Urin-basierte Biomarker, welche die

allgemeine Funktion der Niere anzeigen, sind die GFR (Kreatinin im Urin) und die Albumin- und Proteinmengen im Urin, traditionelle Urinanalyse (einschließlich Osmolarität, Volumen, pH, Elektrolyte, Glukoselevel und Blutvorkommen), Urinsediment-Analyse, Harnstoff-Stickstoff im Blut und Kreatinin im Serum (Lemley 2007; Radi 2019). Ein großer Nachteil dieser wenig bis nicht-invasiven Blut- und Urin-basierten Biomarker ist, dass sie eine relative niedrige Sensitivität und Spezifität haben Nierenschäden früh anzuzeigen und deshalb verschiedene Stadien, Arten und Ursachen der AKI und CKI nicht zureichend unterschieden werden können (Bonventre et al. 2010; Molitch et al. 2010; Vaidya et al. 2008). So wurde zum Beispiel aus klinischen Studien berichtet, dass etwa 25 bis 50% der untersuchten Diabetes-Patienten mit signifikant reduzierter Nierenfunktion keine veränderten Albuminkonzentrationen im Urin zeigen (Macisaac und Jerums 2011). Die Unterscheidung verschiedener Stadien von CKD ist allerdings äußerst wichtig, da je nach Alter, Ursache und Geschwindigkeit der Krankheitsprogression die Prognosen sehr unterschiedlich ausfallen können (Matovinović 2009). Alternativ kann eine Diagnostik mittels histopathologischen Untersuchungen einer Biopsie, das heißt einer Gewebeprobe erfolgen, mit Hilfe derer die Art, die Lokalisation und der Grad der Nierenschädigung identifiziert werden kann. Diese Diagnostik ist allerdings hoch invasiv und wird nur bei begründetem Verdacht auf eine schwere Nierenschädigung durchgeführt (Lemley 2007). Aufgrund dieser Einschränkungen der klassischen Biomarker für Nierenschäden wird sowohl im Bereich der Toxikologie als auch der Pharmakologie an weiteren Biomarkern geforscht. Ein Fokus liegt dabei auf Kandidaten, welche in einfach zu gewinnendem Probenmaterial wie zum Beispiel Urin adressiert werden können. Ein großer Schritt wurde die letzten Jahre zum Beispiel für die neuen Proteinbiomarker *Kidney Injury Molecule-1* (KIM-1), Osteopontin (OPN), Cystatin C (CYSC), Clusterin (CLU) und das Neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL) gemacht. Diese Proteine wurden 2015 für die Verwendung als Biomarker für Nierenschädigung in präklinischen Studien (Ennulat und Adler 2015) und 2018 für die Anwendung in klinischen Phase I Studien zur Ergänzung klassischer Biomarker für die Schädigung proximaler Tubuluszellen in gesunden Menschen qualifiziert (FDA 2018).

Diese neueren Proteinbiomarker zeigen dabei folgende Arten der Nierenschädigung an (Bonventre et al. 2010):

- KIM-1: Proximale Tubulus-Schädigung
- OPN: Proximale und distale Tubulus-Schädigung
- CYSC: Proximale Tubulus-Schädigung und Schädigung des Glomerulus

- NGAL: Proximale und distale Tubulus-Schädigung
- CLU: Proximale und distale Tubulus-Schädigung

Dennoch ist auch die Anwendung dieser Biomarker mit Einschränkungen verbunden. So sind zum Beispiel NGAL, OPN und CLU nicht vollkommen spezifisch für Schäden der Niere und der verschiedenen Abschnitte des Tubulus-Systems (Chorley et al. 2021b). NGAL kann im Rahmen von Entzündungsprozessen im Körper induziert und in den Blutkreislauf und über den Glomerulus in den Urin gelangen ohne dass dabei eine Nierenschädigung zu den erhöhten NGAL Level beiträgt (Vlasakova et al. 2014). Und auch OPN-Fragmente können ebenfalls aus anderen Organen als der Niere in den Urin gelangen (Wadey et al. 2014). Des Weiteren ist der Wert dieser Biomarker für die Diagnose von chronischen Nierenerkrankungen bislang noch umstritten, da Studien darauf hinweisen, dass diese Biomarker das Fortschreiten von Nierenerkrankungen nicht immer unzureichend abbilden (Panduru et al. 2015). Zudem sind einige Biomarker wie KIM-1 zwar spezifisch für das Nephronsegment, geben allerdings keine Hinweise darauf, durch welche Prozesse die verschiedenen Nierestrukturen geschädigt werden. So können sie nicht anzeigen, ob zum Beispiel eine Entzündung der Niere, eine Schädigung der Podozyten oder bereits eine renale Fibrose der Pathogenese unterliegt. Diese Informationen sind allerdings wichtig für eine korrekte Diagnose und Einstufung des Grades der Nierenschädigung in der Klinik. Daher werden in diesem Kontext weitere Kandidaten wie zum Beispiel microRNAs (miRNAs) als potenzielle neue Biomarker für Nierenschäden diskutiert. MiRNAs stehen durch ihre zentrale Rolle in der posttranskriptionellen Regulation und ihren Einfluss auf die Homöostase und die Pathogenese verschiedener Organe in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung von Erkrankungen und könnten so möglicherweise Hinweise auf die zugrundeliegende Pathogenese liefern (siehe auch Abschnitt 1.4.2).

#### **1.4 microRNAs, extrazelluläre Vesikel und ihre Relevanz als potenzielle neue Biomarker für Nierenschäden**

Viele Jahrzehnte hat sich die Forschung auf die weniger als zwei Prozent des Genoms fokussiert welche proteinkodierende Sequenzen beinhalten, während der Rest des Genoms als nicht relevant betrachtet wurde (Bernardi 2019). Obwohl es schon vorher einige Berichte gab, dass diese Bereiche durchaus relevant sind, ist das volle Ausmaß erst 2012 gezeigt worden. Im Rahmen des ENCODE Projektes wurde gezeigt, dass entgegen der früheren Annahme circa 80% des Genoms unter anderem in Form von

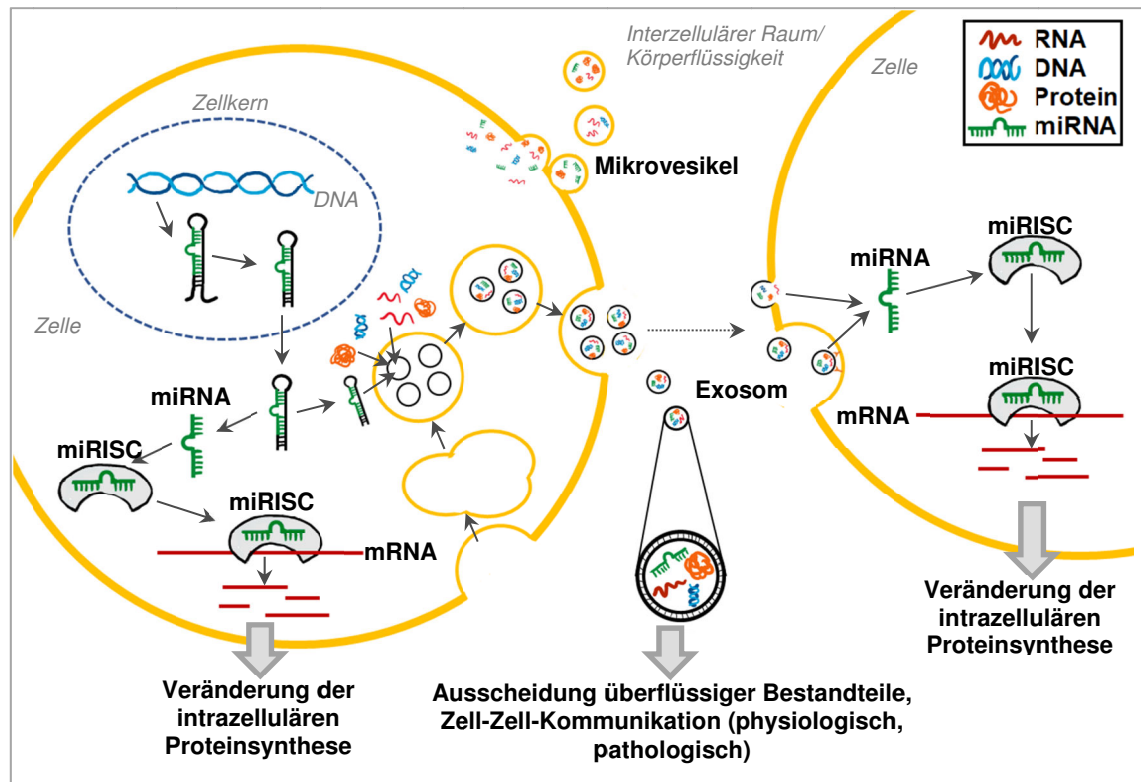
RNA eine Aufgabe erfüllen (The ENCODE Project Consortium 2012). Einige dieser RNA-Spezies werden dabei nicht in Proteine translatiert, sondern erfüllen andere Funktionen. Hierzu gehören unter anderem miRNA, welche nach der Beschreibung der ersten miRNA 1993 (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993) zunehmend in den Fokus der Grundlagen- und Biomarkerforschung gelangt sind.

#### **1.4.1 Biogenese und Funktion von microRNAs und extrazellulären Vesikeln**

MiRNAs sind kleine endogene RNA Spezies mit einer Länge von 19 bis 25 Nukleotiden. Die intrazelluläre Synthese von miRNAs beginnt im Nukleus, in dem die Transkription von über 200 Nukleotid langen, doppelsträngigen pri-miRNAs von der DNA stattfindet (siehe Abbildung 3). Pri-miRNA ist charakterisiert durch einen Doppelstrang, der vergleichbar mit einer Haarnadel durch eine Schleife an einem Ende verbunden ist. Diese pri-miRNA wird durch die DNA-Polymerase II Drosha zur circa 60 Nukleotiden langen prä-miRNA prozessiert und in das Zytoplasma transportiert. Dort wird die prä-miRNA durch den Enzymkomplex *RNA-induced silencing complex* (RISC) in die reife miRNA geschnitten. Damit die miRNA funktionell aktiv sein kann, wird im nächsten Schritt der miRNA Doppelstrang in Einzelstränge getrennt. Einer dieser miRNA Einzelstränge wird in einen Argonaute-2 Komplex eingebunden wodurch der *miRNA-induced silencing complex* miRISC entsteht (Han et al. 2006; O'Brien et al. 2018). Auf funktioneller Ebene sind miRNA posttranskriptionelle Regulatoren und Modulatoren der Genexpression. Intrazellulär binden sie in Form des miRISCs gezielt an proteinkodierende *messenger-RNA* (mRNA), wenn diese eine homologe Sequenz beinhaltet. Ist die miRNA und mRNA Sequenz vollständig kompatibel, wird der Abbau der mRNA durch den miRISC induziert. Bei teilweiser Sequenzhomologie wird die Translation der mRNA in Proteine blockiert. In beiden Fällen blockiert dies die Synthese von Proteinen (Bartel 2018; Xu et al. 2016). Studien haben dabei gezeigt, dass sowohl eine einzelne miRNA mehrere mRNAs binden kann als auch mehrere miRNAs homolog zu einer mRNA sein können (Simkin et al. 2020). Reguliert werden können über diesen Mechanismus sowohl physiologische Prozesse wie Proliferation oder Apoptose wie auch adverse Zellveränderung während Nierenerkrankungen und Nierenschäden (Abbasian et al. 2018).

MiRNAs oder prä-miRNAs können entweder in ihrer Ursprungszelle verbleiben oder in das umgebende Gewebe oder Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin abgegeben werden (Weber et al. 2010). In Körperflüssigkeiten können miRNAs entweder in proteingebundener Form oder in extrazellulären Vesikeln (EVs) vorliegen (Medeiros et al. 2020). EVs sind Partikel aus Doppellipidmembranen, welche von nahezu allen

Zelltypen des Organismus produziert werden können. Anhand ihrer Biogenese und ihrem Größenprofil können EVs in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Die drei Hauptvertreter sind apoptotische Körperchen (Durchmesser: 500 – 5000 nm), Mikrovesikel (50 – 1000 nm) und Exosomen (40 – 100 nm) (Abbasian et al. 2018; Crescitelli et al. 2013; El-Andaloussi et al. 2012).



**ABBILDUNG 3: BIOGENESE UND FUNKTION VON miRNAs UND MIKROVESIKEL**

miRNA: microRNA. miRISC: Englisch *miRNA-induced silencing comple*. mRNA: Messenger-Ribonukleinsäure. DNA: Desoxyribonukleinsäure.

Apoptotische Körperchen entstehen beim kontrollierten Untergang einer Zelle, bei dem Bereiche der Membran abgeschnürt und ungezielt mit Zellinhalten gefüllt werden. Dies führt zur Fragmentierung der sterbenden Zelle in kleine Vesikel, welche von körpereigenen Immunzellen aus dem Organismus entfernt werden können (Arandjelovic und Ravichandran 2015). Mikrovesikel und Exosomen werden im Gegensatz dazu aktiv von lebenden Zellen produziert und sezerniert (siehe Abbildung 3). Mikrovesikel entstehen durch das Abschnüren von Bereichen der Zellmembran, wobei die Plasmamembran umstrukturiert und das Mikrovesikel gezielt unter anderem mit Proteinen, Lipiden und miRNA beladen wird (Tricarico et al. 2017). Exosomen werden im Gegensatz zu Mikrovesikeln aus endosomalen Membranstrukturen innerhalb der Zelle synthetisiert. Auch sie werden über spezielle Transportprozesse gezielt mit zytoplasmatischen Komponenten wie miRNA, mRNA, Lipide und Proteine

beladen (Li et al. 2018b). Durch Exozytose können diese Exosomen in den extrazellulären Raum und Körperflüssigkeiten sekretiert und entweder von anderen Zellen durch Endozytose, Phagozytose oder direkte Fusion mit der Plasmamembran aufgenommen werden. Die genauen Mechanismen sind hier allerdings noch unbekannt (Chen et al. 2012b). Werden Exosomen von anderen Zellen aufgenommen, so kann der Inhalt der Exosomen wie zum Beispiel die darin enthaltenen miRNAs in die biochemischen und molekularbiologischen Prozesse der Zelle wie deren posttranskriptionelle Regulation eingreifen (Qu et al. 2017). Exosomen welche durch Nierenzellen sekretiert werden können alternativ über den Urin ausgeschieden werden. Während Mikrovesikel und Exosomen so zum einem dazu dienen können, Moleküle gezielt aus der Zelle zu entfernen, sind vor allem Exosomen zudem wichtige Bestandteile der Zell-Zell-Kommunikation im Organismus. Sie beeinflussen hierbei sowohl physiologischen Abläufe als auch verschiedenen pathologischen Veränderungen (Lv et al. 2019; Tricarico et al. 2017). In der Niere wurde zum Beispiel beschrieben, dass Exosomen eine zentrale Rolle in der intra-Nephron Kommunikation spielen: So kommunizieren nicht nur Zellen des Glomerulus wie Mesangialzellen und Podozyten über den Austausch von EVs, sondern auch glomeruläre Zellen mit Tubuluszellen, Tubuluszellen verschiedener Nephronsegmente untereinander und Tubuluszellen mit anderen Zelltypen wie interstitialen Fibroblasten (Lv et al. 2019). So wurde unter anderem beschrieben, dass Exosomen im Urin die Expression von Wasser- und Elektrolyt-Transportern in späteren Segmenten des Nephrons und somit die Nierenfunktion regulieren können (Rigalli et al. 2020). Die Assoziation von Exosomen mit der Regulation der Nierenfunktion macht sie zu interessanten Biomarkern für pathologische Veränderungen der Niere.

#### **1.4.2 microRNAs im Urin als potenzielle Biomarker für Nierenschäden**

Sowohl die Sekretion von miRNAs als auch allgemein die Sekretion von EVs durch renale Zellen kann während einer AKI oder CKI verändert sein und den Krankheitsverlauf beeinflussen. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass durch Puromycin-geschädigte Podozyten EVs mit miRNA freisetzen, welche vom Glomerulus durch das Nephron zu den proximalen Tubuluszellen transportiert werden und dort mittels miRNAs Apoptose induzieren, wodurch die Nierenschädigung weiter fortschreitet (Jeon et al. 2020). *In vitro*-Studien konnten die generell erhöhte Sekretion von EV unter anderem mit einer Exposition der Zellen gegenüber TGF- $\beta$ 1, einem Mediator der Fibrose, Albuminurie, erhöhten Glukoselevel, saurem pH, Hypoxie und oxidativen

Stress assoziieren (De et al. 2017; Jing et al. 2019; Liu et al. 2020b). Die Veränderung der EV und miRNA Sekretion wurde bislang in verschiedenen Arten der Nierenschädigung beschrieben, von Substanz-induzierten AKI (Chorley et al. 2021b) bis hin zu CKI oder CKD wie Diabetes-, AA- oder Bluthochdruck-induzierter Nephropathie (Chen et al. 2017a; De et al. 2017; Karanović et al. 2021; Kwon et al. 2017; Li et al. 2015b; Zhao et al. 2020b)

MiRNAs im Urin haben folgende Vorteile als neue Biomarker für Nierenschäden:

1. MiRNAs sind direkt mit molekularbiologischen Vorgängen in der Nierenschädigung assoziiert (*vide supra*).
2. Manche miRNAs sind spezifisch für bestimmte Segmente des Nephrons, und eine Freisetzung in den Urin könnte somit einen Hinweis auf den Ort der Nierenschädigung geben (Chorley et al. 2021b).
3. Die meisten Zelltypen der Niere und alle Zellen entlang des Nephrons produzieren und sekretieren EVs und miRNAs, von den Podozyten des Glomerulus bis zum Sammelrohr, EVs einschließlich Exosomen im Urin werden daher als repräsentativ für das ganze Harnsystem angesehen (Miranda et al. 2014; Miranda et al. 2010; Müller-Deile et al. 2019).
4. MiRNA Biomarker haben möglicherweise das Potential sensitiver als die klassischen Biomarker zu sein. So wurde in Ratten mit minimaler bis moderater Nekrose des Nephrons berichtet, dass miRNAs im Urin wie miR-34c-3p verändert waren während die traditionellen klinischen Biomarker wie Kreatinin den Nierenschaden nicht anzeigten (Church et al. 2014).
5. Urin kann nicht-invasiv gewonnen werden.
6. MiRNAs sind häufig stark konserviert zwischen Spezies einschließlich Mensch und Nagern, weshalb sie gut in präklinischen Tiermodellen untersucht und ebenfalls in der Veterinärmedizin angewendet werden können (Chiang et al. 2010; Li et al. 2010).

EV-assoziierte miRNAs haben gegenüber miRNAs im Gesamturin zusätzlich den Vorteil, dass EVs in Körperflüssigkeiten sehr stabil sind und deren RNA-Inhalt vor dem Abbau durch RNasen geschützt ist (Lv et al. 2013). Diese Aspekte tragen dazu bei, dass Urin-miRNAs als komplementäre Biomarker zu den klassischen Biomarker für Nierenschäden zur Verbesserung der Diagnostik diskutiert werden. Die Hoffnung ist, dass (EV) miRNA-Biomarker die zugrundeliegende Nierenschädigung spezifischer und sensitiver anzeigen können. Aktuell gibt es noch keine durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) validierten miRNA Biomarker zur Identifikation von Risiko,

Diagnose, Monitoring und Prognose von Nierenschäden oder zur Untersuchung der Sicherheit von potenziell nephrotoxischen Substanzen. Dies liegt unter anderem an der teuren und zeitaufwändigen Validierungsarbeit und bislang ungelösten technischen und methodischen Herausforderungen bei miRNAs im Gesamturin und Urin-EVs (Chorley et al. 2021a). Dennoch werden zunehmend groß angelegte, systematische Metastudien durchgeführt, um die Daten verschiedener Publikationen zu integrieren und mögliche Biomarkerkandidaten zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies erfolgte zum Beispiel in der Metastudie des *Health and Environmental Sciences Institute* (HESI) Konsortiums, in welcher präklinische Tiermodelle mit verschiedenen Arten von Nierenschäden verglichen wurden (Chorley et al. 2021b). Auch wenn in vielen Studien entweder Gesamturin oder EV-angereicherte Urinfraktionen hinsichtlich deren miRNA-Profil untersucht wurden, muss für die meisten miRNAs noch untersucht werden, in welcher Urinfraktion die einzelnen miRNA das größte Biomarkerpotential haben.

#### **1.4.3 Herausforderung bei der Identifikation von EV microRNA Biomarkern**

Eine Limitierung bei der Identifikation und Validierung von miRNAs im Gesamturin oder Urin-EVs als neue Biomarker für Nierenschäden sind bis heute ungelöste Problematiken in den Bereichen der Urinkollektion und Lagerung, Isolation, miRNA Detektion und Auswertung. So können unter anderem Parameter bei der Lagerung und dem Prozessieren des Urins, wie zum Beispiel die Zentrifugationsgeschwindigkeit, Dauer bis zum Einfrieren, Dauer der Lagerung und Anzahl der Auftauzyklen und die Verwendung von Stabilisatoren die spätere Analyse von Urin einschließlich EV miRNAs beeinflussen (Chorley et al. 2021a). Im Bereich der Isolation von EVs ist eine der größten Herausforderungen, dass sich die physikochemischen und biologischen Eigenschaften teilweise aber nicht vollständig zwischen den EV-Subtypen wie Exosomen, Mikrovesikeln, Chylomikronen und HDL überschneiden. So überschneiden sich zum Beispiel die Größenprofile von Exosomen, Mikrovesikeln und HDL (Abbasian et al. 2018; Crescitelli et al. 2013; El-Andaloussi et al. 2012). Eine gezielte Isolation bestimmter Subtypen und nachfolgend die klare Zuordnung von Vesikelinhalten wie miRNAs zu einem bestimmten EV-Subtypen ist mit den aktuellen Isolationsmethoden noch immer schwierig (Ludwig et al. 2019). Präzipitationsmethoden zum Beispiel basieren auf einer verhältnismäßig unspezifischen Fällung der EVs aus dem Medium durch Reduktion der Hydratation (Carnino et al. 2019; Yamamoto et al. 1970). Daher ist es wichtig, dass größere EVs wie apoptotische Körperchen vorher durch eine



Zentrifugation bei hohen Geschwindigkeiten aus der Probe entfernt werden. Vorteile der Methode sind, dass sie technisch gut umsetzbar ist und auch in kleinen Urinvolumina angewendet werden kann. Diese Präzipitationsmethoden können dabei in höheren Konzentrationen an Exosomen als andere Methoden resultieren allerdings isolieren sie ebenso andere Vesikel mit ähnlicher Größenverteilung wie LDL und HDL-assoziierten Apolipoproteine und Proteine (Coughlan et al. 2020; Karttunen et al. 2019). Die Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatography* oder SEC) basiert auf einer Auftrennung von Vesikeln und Proteinen aufgrund ihrer Größe. Dabei wird die Probe auf eine Säule gegeben, welche mit einer porösen Matrix gefüllt ist. Die Partikel und Moleküle werden durch die Matrix geleitet, wobei große Moleküle nicht in die Poren eindringen können und somit schneller durch die Säule fließen, während kleinere Moleküle in die Poren gelangen können und somit eine größere Retentionszeit auf der Säule haben (Monguió-Tortajada et al. 2019). Ein Nachteil dieser Methode ist die geringe Ausbeute, die Verdünnung der isolierten EVs in einem großen Probenvolumen und die zeitaufwändige und arbeitsintensive Durchführung. Für die Detektion von miRNAs können quantitative real-time PCR (qRT-PCR)-Methoden, DNA-Mikroarrays oder Sequenzierung der neuen Generation verwendet werden. Diese Methoden unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihres Durchsatzes, sondern auch bezüglich ihrer Sensitivität (Chorley et al. 2021a; Mestdagh et al. 2009). Neben der EV und miRNA Isolation und Detektion ist auch die Datenanalyse einschließlich der Normalisierungsstrategie noch nicht standardisiert, obwohl die Normalisierungsmethode einen großen Einfluss auf die Ergebnisse hat (Meyer et al. 2012). So können miRNA Veränderungen in Gesamturin oder Urin-EVs bislang sowohl auf interne Kontroll-miRNAs, Kreatinin im Urin, als auch auf die Anzahl der Exosomen, das Nierengewicht oder sogar das gesamte Körpergewicht normalisiert werden. Empfohlen werden aktuell die Normalisierung auf körpereigene Referenz-miRNAs oder andere kleine RNA-Spezies, wodurch sowohl die Variabilität zwischen Individuen adressiert werden kann als auch eine Variabilität zwischen der Aufarbeitung der einzelnen Proben. Diese Referenz-miRNA sollte sowohl unter Normalbedingungen als auch während einer Erkrankung konstant bleiben. Allerdings wurden bislang noch keine ausreichend stabilen, universalen Kontroll-miRNAs in Körperflüssigkeiten identifiziert (Chorley et al. 2021a). Aktuell wird dieses Problem in der Praxis gelöst, indem exogene, synthetische miRNAs den Proben vor der Aufarbeitung als sogenannte *spike-in* Kontrollen zugesetzt werden, um zu Normalisieren und die Effizienz der miRNA Isolation und Detektion zu überprüfen (Mitchell et al. 2008). Die biologische Variation zwischen verschiedenen Individuen wie zum Beispiel die unterschiedliche Urinproduktion einer Spezies wird hierbei aber nicht berücksichtigt.

Denn je nach verwendeter Isolations-, Detektions- und Analysestrategie können sich die Ergebnisse Analyse von EVs und miRNA-Profilen stark unterscheiden und dadurch den Vergleich verschiedener publizierter Studien erschweren (Meyer et al. 2012; Mussack et al. 2019; Srinivasan et al. 2019). Daher muss im Bereich der Biomarkerforschung in Zukunft eine Standardisierung der methodischen Parameter erfolgen und sich durchsetzen, um deregulierte miRNAs in einem bestimmten Krankheitskontext identifizieren und validieren zu können. In den letzten Jahren wurden erste Versuche einer Standardisierung in der Form von frei zugänglichen und detaillierten Protokollen durch das *External RNA Controls Consortium* veröffentlicht (ERCC 2021). Doch weisen auch diese Protokolle aktuell noch Lücken auf. So gibt es unter anderem aktuell noch keinen Leitfaden für die Isolation von miRNAs aus Urin. Weitere Studien sind nötig, um einen Konsens im Feld der miRNA Biomarkerforschung zu finden. In der Zwischenzeit wird zum Beispiel von der Gesellschaft für Extrazelluläre Vesikel im Rahmen der *Minimal information for studies of extracellular vesicles*-Richtlinie gefordert, dass EV-Präparationen zum Beispiel durch die Quantifizierung von Proteinbiomarkern in Western Blot Analysen charakterisiert werden müssen (Théry et al. 2018). Zusätzlich kann die Analyse von EV miRNAs durch zwei verschiedene Isolations- und Detektionsmethoden die Assoziation von miRNAs mit EVs unterstützen.

## 1.5 Ziele dieser Dissertation

Schädigungen der Niere haben gravierende Auswirkungen auf die Lebensqualität und das Gesundheitssystem, allerdings ist die Detektion von CKD bislang noch unzureichend. In diesem Kontext werden in der Medizin und Toxikologie miRNAs im Urin als potenzielle neue Sicherheitsbiomarker für Nierenschäden diskutiert.

Das Ziel dieser Arbeit ist, die miRNA Profile zweier präklinischen Tiermodelle für sub-chronische Nierenerkrankungen und CKD, der ZSF1-Ratten und der mRenTG-Ratten, zu charakterisieren und zu vergleichen. Beide Tiermodelle entwickeln Nierenschäden einschließlich renale Fibrose und könnten sich somit als Tiermodell für CKI eignen, was durch Verwendung von meistens akut wirkenden Nierentoxinen schwieriger ist. Adressiert werden soll hierbei unter anderen, ob miRNAs im Urin die Krankheitsprogression besser abbilden als die bislang validierten Proteinbiomarker und ob die Anreicherung von EVs vor der miRNA Isolation und Detektion von Vorteil ist. Um eine mögliche Assoziation veränderter miRNAs mit zentralen Schädigungsprozessen der Niere wie zum Beispiel der renaler Fibrose herzustellen, werden zusätzlich humane renale proximale Tubuluszellen als ein *in vitro*-Zellmodell für renale Fibrose hinsichtlich ihrer EV-miRNA Sekretion untersucht und mit den miRNA Profilen in den Tiermodellen verglichen. Des Weiteren wird ein Vergleich der zwei Tiermodelle mit publizierten miRNA Daten zu Nephrotoxin-induzierter Glomerulonephritis und AA-induzierter Nephropathie durchgeführt. Der Vergleich mit anderen Arten von Nierenerkrankungen soll Aufschluss darüber geben, ob die identifizierten miRNAs in verschiedenen Modellen von Nierenschädigungen unterschiedlicher Ätiologie zu finden sind und gegebenenfalls mit Ätiologie-unabhängigen renalen Pathomechanismen assoziiert sind. Dies soll dazu beitragen, Veränderungen spezifischer miRNAs besser zu charakterisieren und ihre Spezifität für ein Stadium oder eine Art der Nierenerkrankungen zu identifizieren. Zudem werden Genexpressionsprofile im Nierengewebe der ZSF1- und mRenTG-Ratten mit den veränderten miRNA Profilen in den jeweiligen Modellen assoziiert (basierend auf bekannten und vorhergesagten miRNA-mRNA-Paarungen), um Hinweise zwischen einer funktionellen Assoziation zwischen veränderten miRNAs im Urin und der zugrundeliegenden renalen Pathogenese *in vivo* zu erhalten. Um zusätzlich die Humanrelevanz der Genexpressionsänderungen in ZSF1-Tieren besser einschätzen zu können, werden diese zusätzlich mit publizierten Genexpressionsdaten von Patienten mit diabetischer Nephropathie (DN) verglichen. Die Ergebnisse sollen den Wert des ZSF1- und mRenTG-Tiermodelles für die Erforschung von humanrelevanter CKD

Pathomechanismen Biomarkern zeigen und dabei helfen neue miRNA Biomarkerkandidaten für die Progression CKI und CKD, sowie Pathomechanismen wie renale Fibrose in Gesamturin oder Urin-EVs zu identifizieren.

Trotz des Fokus dieser Arbeit auf die adversen Veränderungen in der Niere und damit potenziell assoziierten Urin-basierte Biomarker werden zusätzlich die Veränderungen in der Genexpression von Herz und Leber in ZSF1-Ratten und Herz in mRenTG-Ratten analysiert. Das ganzheitliche Verständnis der Pathogenese in den verwendeten Tiermodellen ist essentiell, um den vollständigen Wert der präklinischen Tiermodelle für die Untersuchung humanrelevanter Pathomechanismen zu definieren. Ein besseres Verständnis der Abläufe der Pathogenese im Rahmen von krankheitsassoziierten und substanzinduzierten Nierenschäden und der verwendeten Tiermodelle solle zur besseren Risikobewertung von Nephrotoxinen, zur effektiveren Entwicklung von Pharmaka gegen CKI und CKD, verbesserten Diagnostik, zur Entwicklung neuer und prädiktiver *in vitro*-Modellen und zur Reduktion von Tierversuchen beitragen.

## 2. Material

### 2.1 Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 1: Reagenzien und Chemikalien**

Reagenzien & Chemikalien	Hersteller
StemPro <sup>®</sup> Accutase <sup>®</sup> Cell Dissociation Reagent	Gibco <sup>™</sup> Life Technologies (USA)
Humanes Serumalbumin (30% Lösung in 0,85 % NaCl, 10 ml und 50 ml)	Sigma Aldrich (Deutschland)
CASYclean	Omni Life Science GmbH & Co. KG (Deutschland)
CASYton (10l)	Omni Life Science GmbH & Co. KG (Deutschland)
Destilliertes Wasser (RNase, DNase und Nuclease frei)	Qiagen (Deutschland)
Freezing Medium Cryo-SFM	PromoCell (Deutschland)
RenaLife <sup>™</sup> Epithelial Medium Complete Kit	Lifeline <sup>®</sup> Cell Technology (USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS); steril-filtriert, geeignet für Zellkultur (mit oder ohne Magnesium und Calcium)	Sigma Aldrich (Deutschland)
Ethanol (>99,8 %)	Honeywell Riedel-de-Haën von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Chloroform (100 %)	Merck KGaA (Deutschland)
Captopril	Sigma Aldrich, St. Luis (USA)
L-NAME	Sigma Aldrich, St. Luis (USA)
Invitrogen <sup>™</sup> NuPage <sup>™</sup> MES SDS Running Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Invitrogen <sup>™</sup> NuPage <sup>™</sup> Sample Reducing Agent	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Invitrogen <sup>™</sup> NuPage <sup>™</sup> Antioxidant	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Invitrogen <sup>™</sup> NuPage <sup>™</sup> LDH Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Invitrogen <sup>™</sup> MagicMark <sup>™</sup> XP (Western Protein Standard)	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Invitrogen <sup>™</sup> SeeBlue <sup>®</sup> Plus2 Prestained Standard	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Invitrogen <sup>™</sup> SimplyBlue SafeStain (1L)	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Pierce <sup>™</sup> 20x PBS Tween <sup>™</sup> -20	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Triton <sup>®</sup> X-100 (Molekularbiologie Grad)	Promega (USA)
Pierce <sup>™</sup> RIPA Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Tris-EDTA Pufferlösung (BioUltra, für Molekularbiologie, pH7.4)	Sigma Aldrich (Deutschland)
β-Mercaptoethanol (>99,0%)	Sigma Aldrich (Deutschland)
Recombinantes humanes TGF-β1 Protein (Activ) (ab50038)	Abcam (UK)
Desomed Rapid AF	Dr. Schumacher GmbH (Deutschland)
Anti-Calnexin Antikörper (ab22595)	Abcam (UK)
Recombinanter Anti-ALIX Antikörper [EPR15314] - N-terminal (ab186429)	Abcam (UK)
Recombinanter Anti-TSG101 Antikörper [EPR7130(B)] (ab125011)	Abcam (UK)
Paraplast <sup>®</sup>	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Proteinase K (20mg/ml)	Qiagen (Deutschland)
ssniff <sup>®</sup> Standard Rattenfutterpellets	ssniff Spezialdiäten GmbH (Deutschland)
Purina 5008 Rattenfutter	Charles River Laboratories (Deutschland)
Davidson Lösung	Sigma Aldrich, St. Luis (USA)
RLT Lysepuffer	Qiagen (Deutschland)

Bolt <sup>®</sup> MES-SDS-Laufpuffer	Life technologies von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Bolt <sup>®</sup> Antioxidans	Life technologies von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Bolt <sup>®</sup> Sample Reducing Agent	Life technologies von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Bolt <sup>®</sup> Sample Buffer	Life technologies von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
QIAzol <sup>®</sup> Lysis Reagent	Qiagen (Deutschland)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
ABI <sup>®</sup> 384-Loch Reaktionsplatten mit Barcode	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Cellstar <sup>®</sup> 6-Loch Zellkultur-Platten (steril)	Greiner Bio-One (Österreich)
CellBIND <sup>®</sup> 75cm <sup>2</sup> U-Shaped Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap	Corning, Inc. (USA)
Amicon <sup>®</sup> Ultra-15 Zentrifugendiftereinheiten (PLGC Ultracel-PL Membran, 10 kDa)	Merck Millipore Ltd. (Irland)
Amicon <sup>®</sup> Ultra-4 Zentrifugendiftereinheiten (PLGC Ultracel-PL Membran, 10 kDa)	Merck Millipore Ltd. (Irland)
Costar <sup>®</sup> 50 ml Reagenzreservoir	Corning, Inc. (USA)
96 Well ELISA-Platten, MICROLON <sup>®</sup> , U-Boden, Med. binding	Greiner Bio-One (Österreich)
BD Falcon <sup>®</sup> 96-Loch Platten	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Combitips plus (10 ml/5 ml)	Eppendorf AG (Deutschland)
Einwegkanülen Sterican 0,8x40mm (21G)	B. Braun AG (Deutschland)
Omnifix <sup>®</sup> Luer Solo (3 ml)	B. Braun AG (Deutschland)
Eppendorfgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml; 5ml)	Eppendorf AG (Deutschland)
BD Falcon <sup>®</sup> -Röhrchen (15ml, 50ml) (steril)	Corning, Inc. (USA)
120 ml Mehrzweckgefäß mit Schraubverschluss (steril)	Sarstedt AG & Co (Deutschland)
Low-bind Eppendorfgefäße (0,5ml)	Eppendorf AG (Deutschland)
ABI <sup>®</sup> MicroAmp <sup>®</sup> Optische Klebefolie	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
SafeGrip <sup>®</sup> Nitril-Handschuhe	Süd-Laborbedarf Gauting (Deutschland)
PCR Tubes (dünn, PCR clean) (0,5ml)	Eppendorf AG (Deutschland)
Costar <sup>®</sup> Pipetten, gestopft (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) (steril)	Corning, Inc. (USA)
Pipettenspitzen steril, PCR-Grad (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG (Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 300 µl; 1 ml; 2,5 ml; 5 ml)	Eppendorf AG (Deutschland)
CASY Röhrchen	Omni Life Science GmbH & Co. KG (Deutschland)
0,22 µm PES Einweg-Filtersystem (steril, niedrige Proteinbindung)	Corning, Inc. (USA)
Pipettenspitzen (10 µL)	Biozym Scientific GmbH (Deutschland)
ABI <sup>®</sup> MicroAmp <sup>™</sup> Optical 384-Well Reaktionsplatte mit Barcode	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
BD Microtest <sup>™</sup> Tissue Culture Plate, 96 well, flat bottom	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Invitrogen <sup>™</sup> NuPage <sup>™</sup> 4-12% Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
MicroA <sup>™</sup> Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Filter tips Gel 20 (steril)	Greiner Bio-One (Österreich)

## 2.3 Kits und Mikroarrays

**Tabelle 3: Kits und Mikroarrays**

Kits and Mikroarrays	Hersteller
Pierce™ Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Pierce™ Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
NuPage® Bis/Tris-Gele (12%)	Life technologies von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
QiaShredder Kit	Qiagen
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies (Deutschland)
Agilent Small RNA Kit	Agilent Technologies (Deutschland)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche AG (Schweiz)
ExiLent SYBR® Green Master Mix Kit	Exiqon (Dänemark)
ABI® GeneChip® WT Plus Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
ABI® GeneChip® Hybridisation, Wash and Stain Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Clariom™ D Assay, rat	Affymetrix von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
ABI® GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
4-plex customized panel	Meso Scale Discovery (USA)
miRCURY® Exosome Cell/Urine/CSF Kit	Qiagen (Deutschland)
miRCURY® LNA SYBR® Green PCR Kits	Qiagen (Deutschland)
miRCURY® LNA™ RT Kit	Qiagen (Deutschland)
miRCURY® Exosome Isolation Kit- Cells, urine and CSF	Exiqon (Dänemark)
miRCURY® RNA Isolation Kit – Cell & Plant	Exiqon (Dänemark)
miRNeasy Mini Kit	Qiagen (Deutschland)
qEVoriginal (70nm)	Izon Science Ltd (Neuseeland)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Deutschland)
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen (Deutschland)
ABI® TaqMan® Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
ABI® High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Universal cDNA Synthesis Kit II	Exiqon (Dänemark)
Universal Rat Reference RNA	Stratagene von Agilent Technologies (Deutschland)
Invitrogen™ iBlot® Gel Transfer Stack, PVDF, Regular	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Invitrogen™ WesternBreeze™ Chemiluminescent Kit, anti-rabbit	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
RNase-freie DNase Set (50)	Qiagen (Deutschland)
Amax® Cell line Nucleofector™ Kit R	Lonza Group AG (Schweiz)
Amax® Basic Nucleofector™ Kit Pri Mammalian Epithelial Cell	Lonza Group AG (Schweiz)

## 2.4 Puffer und Lösungen

### Lyse-Puffer

50 ml RLT-Puffer  
0,5 ml β-Mercaptoethanol

### Lysepuffer mit Protease & Phosphatase-Inhibitor

980 µL Pierce™ RIPA Puffer  
10 µL Pierce™ Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail  
10 µL Pierce™ Halt™ Protease Inhibitor Cocktail

## 2.5 qRT-PCR Assays und Oligonukleotide

**Tabelle 4: Selection of PCR Assays und Oligonukleotide**

M(i)RNA	Species	Aliases	Assay	Gen/miRNA Referenz
U6	Human, rat	/	YP02119464	miRBase: U6snRNA
GAPDH	human	G3PD, GAPD, HEL-S-162eP	Hs02786624_g1	NM_002046.5
PPIA	human	CYPA, CYPH, HEL-S-69p	Hs04194521_s1	NM_021130.4
COL1A1	human	EDSC, OI1, OI2, OI3, OI4	Hs00164004_m1	NM_000088.3
COL4A1	human	BSVD, RATOR	Hs00266237_m1	NM_001303110.1
ACTA2	human	AAT6, ACTSA, MYMY5	Hs00426835_g1	NM_001141945.2
VIM	human	CTRCT30, HEL113	Hs00958111_m1	NM_003380
CDH11	human	CAD11, CDHOB, OB, OSF-4	Hs00901479_m1	NM_001308392
CTGF	human	CCN2, HCS24, IGFBP8, NOV2	Hs00170014_m1	NM_001901
MMP2	human	CLG4, CLG4A, MMP-2, MMP-II, MONA, TBE-1	Hs01548727_m1	NM_001127891
FN1	human	CIG, ED-B, FINC, FN, FNZ, GFND, GFND2, LETS, MSF	Hs01549976_m1	NM_001306129
IL11	human	AGIF, IL-11	Hs01055413_g1	NM_000641.3
SERPINE1	human	PAI, PAI-1, PAI1, PLANH1	Hs00167155_m1	NM_000602
Oligo	Species	Sequenz	Assay	miRBase Eintrag
cel-miR-39-3p	c. elegans	UCACCGGGUGUAAA UCAGCUUG	RNA Spike-In Kit, For RT	MIMAT0000010

Alle genannten Assays wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA) bezogen. Das Oligonukleotid cel-miR-39-3p, die 374 und 93 miRNA-qRT-PCR Assays sowie die internen Kontrollen, welche für das *in vivo* und *in vitro* miRNA Profiling verwendet wurden, wurde von Qiagen (Deutschland) bezogen. Die miRNA-Assays sind in Anhang-Tabelle 29 spezifiziert.

## 2.6 Versuchstiere und humane Zellen

Als präklinisches Modell für das MetS wurden fettleibige ZSF1 (ZSF1-Lepr<sup>fa</sup>Lepr<sup>cp</sup>/Ctrl) (Stamm-Identifikation: 378) und schlanke ZSF1-Ratten (Stamm-Identifikation: 379) verwendet, welche von Charles River Laboratories International, Inc. (Deutschland) bezogen wurden. Die TGR(mREN2)27 Ratten (Bay:SPRD-TGR(mREN2)27-F1) wurden von der Bayer Werkszucht bereitgestellt. Die SD-Ratten wurden von Charles River Laboratories (Sulzbach, Deutschland) bezogen. Alle Tiere wurden unter



Einhaltung optimaler Hygienestandards in Makrolon® Typ IV Käfigen mit Einstreu in Gruppen von zwei (ZSF-1) oder drei (mRenTG) Tieren und einem Licht-Dunkelheit-Zyklus von 12 Stunden gehalten. Futter und Trinkwasser und wurden *ad libitum* bereitgestellt. Alle Vorgänge im Rahmen von Bestellung, Lieferung, Haltung, Versorgung und Einsatz der Tiere wurden nach den geltenden Tierschutzrichtlinien und -Verordnungen durchgeführt.

Für *in vitro*-Versuche wurden primäre humane renale proximale Tubulus Epithelzellen (hRPTECs) von der Firma Lifeline® Cell Technology (USA) ohne klinische Daten erworben. Nach Angaben des Anbieters wurden alle gespendeten Gewebe mit informierter Einwilligung und in Übereinstimmung mit der *Declaration of Helsinki, The Human Tissue Act* (UK), CFR Artikel 21, und HIPAA-Regulationen bezüglich der Gewinnung und dem Umgang mit humanen Geweben für Forschungszwecken gewonnen.

## 2.7 Geräte

**Tabelle 5: Geräte**

Gerät	Hersteller
12-Kanalpipette Reference 2 (25-200µL)	Eppendorf AG (Deutschland)
Matrix™ Impact2 Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (USA)
Concentrator 5301	Eppendorf AG (Deutschland)
Eppendorf Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG (Deutschland)
Eppendorf-Pipetten (2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 200 µl; 1 ml; 2,5 ml; 5 ml)	Eppendorf AG (Deutschland)
Pipettus® Standard	Hirschmann
IKAMAG RET	IKA Labortechnik
Invitrogen™ iBlot Gel Transfer Device/Dry Blotting System	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Eppendorf-Multipipette Plus	Eppendorf AG (Deutschland)
GeneChip® Fluidic Station 450	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
GeneChip® Hybridization Ofen 645	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
GeneChip® Scanner 3000	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Mastercycler® nexus X2	Eppendorf AG (Deutschland)
Mikroskop Fluovert FS	Leitz (Deutschland)
ADVIA 2400 Analyzer	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland
Cobas c111 Analyzer	Hoffmann-La Roche AG (Schweiz)
Invitrogen™ Ambion™ Magnet Stand-96	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
SpectraMax® Plus Photometer	Molecular Devices, LLC (USA)
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
Plattenschüttler Titramax 101 und Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & CoKG (Deutschland)
Electrophoresis power supply EPS 500/400	Pharmacia (Schweden)
Waage AG135	Mettler-Toledo (USA)
ABI® ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Schwingmühle MM200	Retsch GmbH (Deutschland)
Edelstahl Beads, 5mm	Qiagen (Deutschland)
Thermomixer comfort (1,5ml; 2ml)	Eppendorf AG (Deutschland)
Vortex-Genie™ 2	Scientific Industry. Inc (USA)

Vortex REAX top	Heidolph Instruments GmbH & CoKG (Deutschland)
Zellzählgerät CASY®	Roche Innovatis AG (Schweiz)
Wasserbad Precision GP10	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Cytation Image Reader	BioTek Instruments, Inc. (USA)
Zentrifugen 4K15C und 4K16	Sigma Aldrich (Deutschland)
MaxiSafe 2020 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
BBD 6220 CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Red Rocker Plattenschüttler PR50	Hoefler Inc ( )
Mini Gel Tank	Life technologies von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)

## 2.8 Software und Webapplikationen

**Tabelle 6: Software und Webapplikationen**

Software	Hersteller
Genedata Profiler, v10.1 bis v11.0	Genedata (Schweiz)
Ingenuity Pathway Analysis (IPA), v52912811	Qiagen (Deutschland)
GraphPad Prism v8.2.1	GraphPad Software, Inc. (USA)
Image Lab™ v6.0.1	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
ABI® QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
AGCC Software: Command Console® V4.0.0.1567	Affymetrix von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
Agilent 2100 Expert software_VB.02.08.51648	Agilent Technologies (USA)
Transcriptome Analysis Console (TAC) software v4.0.2.15	Affymetrix von Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
SPECTRAMax Pro Software v4.6	Molecular Devices, LLC (USA)
DISCOVERY WORKBENCH v4.0	Meso Scale Discovery (USA)
<a href="http://mirandola.iit.cnr.it/">http://mirandola.iit.cnr.it/</a>	Universität Kopenhagen (Russo et al. 2018)
<a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a>	Universität Manchester
<a href="http://www.lirmed.com/tam2/">http://www.lirmed.com/tam2/</a>	Universität Tianjin und Universität Peking (Li et al. 2018a)
TXG-MAPr – WGCNA modules based on TG-GATEs data	LACDR, Universität Leiden (Sutherland et al. 2016)

Die TXG-MAPr Webapplikation wurde im Rahmen der IMI2 eTRANSafe und TransQST Projekte zur Verfügung gestellt durch die Division of Drug Discovery and Safety, Leiden Academic Center for Drug Research (LACDR) der Universität Leiden (Niederlande). Unser besonderer Dank gilt Giulia Callegaro (LACDR, Universität Leiden, Leiden, Niederlande), Steven J. Kunnen (LACDR, Universität Leiden, Leiden, Niederlande), Jeffrey J. Sutherland (Indiana Biosciences Research Institute, Indianapolis, USA), Jennifer Mollon (AbbVie Deutschland GmbH & Co KG, Ludwigshafen, Deutschland), Yue Webster (Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA), Panuwat Trairatphisan (Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland), Emre Guney (Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Pompeu Fabra University (UPF), Barcelona, Spanien), Janet Piñero Gonzalez (Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Pompeu Fabra University (UPF), Barcelona,

Spanien), Solène Grosdidier (*Erasmus MC, Rotterdam, Niederlande*), Wouter den Hollander (*LACDR, Universität Leiden, Leiden, Niederlande*), James L. Stevens (*LACDR, Universität Leiden, Leiden, Niederlande*) und Bob van de Water (*LACDR, Universität Leiden, Leiden, Niederlande*).

### 3. Methoden

#### 3.1 *in vivo* Studien

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen bewilligt und erfolgten in Übereinstimmung mit den deutschen Richtlinien zur Haltung und Verwendung von Labortieren. Die *in life*-Phasen der ZSF1-Tierstudien wurden in den Laboren von Dr. Agnès Bénardeau (Labor Cardiovascular Research, Bayer AG, Wuppertal), Dr. Lucas Hofmeister (Heart and Vascular Diseases IX, Bayer AG, Wuppertal) und Dr. Jutta Meyer (Heart and Vascular Diseases X, Bayer AG, Wuppertal) durchgeführt. Die Durchführung der mRenTG-Tierversuche erfolgte in den Laboren von Dr. Ilka Mathar (Heart and Vascular Diseases XI, Bayer AG, Wuppertal) und Dr. Peter Sandner (Labor Heart and Vascular Diseases V, Bayer AG, Wuppertal). Eine graphische Darstellung des *in vivo*-Studiendesigns findet sich in Abbildung 13. Die renalen Genexpressionsprofile der ZSF1- und mRenTG-Ratten wurden mit publizierten Daten eines NTS-induzierten Rattenmodells für Glomerulonephritis (Pavkovic et al. 2015a) und eines Modelles für AA-induzierte Nephropathie (Su et al. 2011) verglichen. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der miRNA-Profile im Urin von ZSF1- und mRenTG-Ratten mit dem Rattenmodell für Glomerulonephritis. Details zu den publizierten Studien finden sich ebenfalls in Abbildung 13.

##### 3.1.1 Metabolisches Syndrom-induzierte Nierenschäden in ZSF1-Ratten

Männliche, elf Wochen alte, fettleibige und schlanke ZSF1-Ratten wurden für drei Wochen akklimatisiert. Im Alter von 14, 22 und 26 Wochen wurde von je vier Tieren pro Zeitpunkt Urin gesammelt. Die Tiere wurden dabei einzeln für 16 Stunden bei Raumtemperatur und mit freiem Futterzugang in metabolischen Käfigen gehalten. Je fünf fettleibige und schlanke Tieren im Alter von 14, 22, 26, 46 und 59 Wochen wurden per Zufall für eine Sektion gewählt. Lediglich für den 46 und 59 Wochen-Zeitpunkt wurden nur drei fettleibige Tiere seziiert. Für den 14 Wochen-Zeitpunkt wurde die Niere

entnommen, für die zusätzlichen Zeitpunkte zudem die Leber und das Herz. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden alle Tiere unter Isofluran-basierter Anästhesie durch Entbluten euthanasiert und die entnommenen Organe entsprechend Kapitel 3.1.3 gelagert.

### 3.1.2 Bluthochdruck-induzierte Nierenschäden in TGR(mRen2)27-Ratten

Im Alter von 7,5 Wochen wurden fünf Behandlungsgruppen definiert. In der SD-Kontrollgruppe wurden SD-Ratten ab dem Alter von 7,5 Wochen für acht Wochen mit Normalfutter versorgt (Tabelle 7), während die SD + L-NAME-Gruppe zusätzlich ab Versuchsstart für acht Wochen mit L-NAME behandelt wurde. Die L-NAME Behandlung sollte dabei potenziell endotheliale Schädigungen induzieren. Zusätzlich wurden 7,5 Wochen alte mRenTG-Ratten für acht Wochen mit Captopril, Captopril und L-NAME oder ausschließlich mit L-NAME behandelt (Tabelle 7). Während die ersten beiden Gruppen Kontrollen darstellen sollen, wurde von einer ausschließlichen L-NAME Behandlung von mRenTG-Ratten eine Induktion starken Bluthochdruckes mit Folgeschäden wie CKD oder Herzschädigung erwartet. Die Captopril-Behandlung erfolgte über das Futter (300 mg/kg), welches *ad libitum* zur Verfügung gestellt wurde. Nicht mit Captopril behandelten mRenTG-Ratten wurde 24 Tage vor Versuchsstart das Captopril-Futter auf Mischfutter (50% Captopril-Futter, 50% Normalfutter) und 14 Tage vor Versuchsstart das Mischfutter auf Normalfutter umgestellt.

**TABELLE 7: ÜBERBLICK ÜBER BEHANDLUNGSGRUPPEN DES mRENTG-RATTENMODELLS UND VERWENDETE KONTROLLEN**

mRenTG: Maus Renin-transgene Ratte. SD: Sprague-Dawley-Ratte. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester.

Gruppenname	Genetischer Hintergrund	Behandlung (8 Wochen)	Erwarteter Behandlungseffekt
SD	SD-Ratte	/	Gesunde Kontrolle
<b>SD + L-NAME</b>	<b>SD-Ratte</b>	<b>L-NAME</b>	<b>Moderate endotheliale Schädigung</b>
mRenTG + Captopril	mRenTG-Ratte	Captopril	Gesunde Kontrolle (mit genetischem mRenTG-Hintergrund)
mRenTG + Captopril + L-NAME	mRenTG-Ratte	L-NAME Captopril	Gesunde Kontrolle
<b>mRenTG + L-NAME</b>	<b>mRenTG-Ratte</b>	<b>L-NAME</b>	<b>Ausgeprägter Bluthochdruck und assoziierte Folgeerkrankungen</b>

SD-Ratten wurden durchgehend mit Normalfutter versorgt. Die achtwöchige Behandlung mit L-NAME erfolgte über das Trinkwasser (30 mg/L), welches in lichtgeschützten (braunen) Flaschen *ad libitum* bereitgestellt wurde. Das L-NAME-versetzte Trinkwasser wurde einmal pro Woche ausgetauscht.

Alle Gruppen wurden zum Studienbeginn und Studienende einer Urinkollektion unterzogen. Hierzu wurden die Tiere nach einem Wasserstoß (10 ml/kg Körpergewicht per os) einzeln in metabolische Käfige gehalten und Urin über vier Stunden bei Raumtemperatur und freiem Zugang zu Trinkwasser und Futter gesammelt. Nach achtwöchiger Behandlung wurden die Ratten unter Isofluran-basierter Anästhesie durch Entbluten euthanasiert und die genannten Organe entnommen.

### 3.1.3 Urin- und Gewebeaufarbeitung

Für die klinische Chemie, miRNA- und Biomarkeranalyse wurde frischer Urin (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2) auf Eis gekühlt und für 10 Minuten bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung in Aliquots bei -80 °C gelagert. Während der Sektion wurden die rechte Niere, die Spitze des linken Herzventrikels und ein definiertes Stück aus dem unteren Drittel des linken lateralen Leberlappens entnommen. Die Niere wurde in zwei Polkappen sowie drei transversale Scheiben zerteilt. Das linke Herzventrikel sowie das Leberstück wurden zu Stücken definierter Größe zerkleinert. Für die RNA-Isolation wurden alle Organe unmittelbar in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Für die histologische Untersuchung wurden die entsprechenden Organe unmittelbar in Davidson Lösung (Niere, Leber) oder 10%iger Formalinlösung (Herz) fixiert.

### 3.1.4 Histopathologie

Die histopathologische Untersuchung von Niere, Herz und Leber wurde von Dr. Elke Hartmann und Team (Toxikologie, Pathologie, Bayer AG, Wuppertal) durchgeführt. Hierzu wurden die in Davidson oder Formalin fixierten Gewebe (Kapitel 3.1.3) zugeschnitten, in Paraffin (Paraplast®) eingebettet und in 3 µm dicke Scheiben geschnitten. Für die anschließende Färbung der Niere und Leber wurde Hämatoxylin und Eosin (H&E) verwendet. Das Herzgewebe wurde mittels Sirius Red-Fast Green gefärbt. Die Schnitte wurden von einem zertifizierten Veterinärpathologen unter einem Lichtmikroskop unter Verwendung eines semiquantitativen Einstufungsansatzes

evaluiert (Grad 1: minimal/sehr wenig; Grad 2: Leicht/ wenig/klein; Grad 3: Moderat; Grad 4: Deutlich/viele).

### 3.1.5 Klinische Chemie und Proteinbiomarkern Messung im Urin

Der Kreatinin- und Gesamtproteingehalt im Urin wurde im Labor von Dr. Alexius Freyberger (Klinische Pathologie, Forschung und Frühe Entwicklung, Bayer AG Wuppertal) quantifiziert. Hierfür wurde der Urin bei 3000 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die anschließende Proteinquantifizierung erfolgte über die Pyrogallol Rot-Methode im ADVIA 2400 Analyser. Kreatinin wurde mittels eines enzymatischen Tests im Roche Cobas cIII bestimmt. Die statistische Analyse erfolgte in der Graphad Prism Software unter Verwendung eines zweifachen ANOVA (Kapitel 3.8.3) kombiniert mit einem Šídák's Test für multiple Vergleiche.

Für die Messung der Proteinbiomarker KIM-1, OPN, CYSC und CLU im Urin wurde die MesoScale-Plattform verwendet. Das Messprinzip basiert auf einem Sandwich-ELISA, bei dem Zielproteine durch spezifische Bindung von Antikörpern isoliert und durch spezifische Bindung von Elektrochemilumineszenzmarker (SULFO-TAGs) gekoppelten Antikörpern quantifiziert werden. Die Proteinquantifizierung wurde von Dr. Mira Pavkovic und Kollegen (GBM Research 1, Bayer AG, Wuppertal) unter Verwendung von Platten für die parallele Detektion der vier Biomarkern durchgeführt. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden die Urinproben (Kapitel 1.3.1) auf Eis aufgetaut und 1:10 verdünnt. Die Ergebnisse wurden mittels der firmeneigenen Software nach den Guidelines von MesoScale Discovery Inc. ausgewertet und auf den Kreatiningehalt des Urins normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit der Graphpad Prism Software. Gewählt wurde ein zweifacher ANOVA (Kapitel 3.8.3) kombiniert mit einem Šídák's Test für multiple Vergleiche.

### 3.2 *in vitro*-Studien

Für die *in vitro*-Experimente wurden SV40-transformierte, primäre humane renale proximale Tubuluszellen (hRPTECs) aus der Abteilung von Dr. Kristin Leineweber verwendet. Alle Zellkulturarbeiten wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter sterilen Bedingungen und Verwendung von Einmalhandschuhen an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz durchgeführt. Nicht sterile Lösungen und Materialien wurden vor der Verwendung steril filtriert oder autoklaviert.

### 3.2.1 Transformation und Lagerung von hRPTECs

hRPTEC wurden mit dem *Cell line Nucleofector™ Kit* mit SV40 transformiert. Hierzu wurden hRPTECs in der Passage 0 aufgetaut (siehe Kapitel 3.2.2) und für acht Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Accutase® abgelöst und 1 Millionen Zellen mit 5 µg linearisiertem SV40-Plasmid entsprechend den Herstellerangaben transfiziert. Die Zellsuspension wurde auf zwei Wells einer 6-Well-Platte ausgesät und für 17 Tage in RenaLife™-Medium mit Zusätzen und 2,5 mg/ml Genecitin kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf eine 75 cm<sup>2</sup> CellBind®-Flaschen umgesetzt und für weitere fünf Wochen in Medium mit Genecitin kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Anschließend wurden zur Lagerung eine Million Zellen in 1 ml Cryo-SFM aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.2.2 Auftauen, Passagieren und Kultivieren von hRPTEC/SV40

Die SV40-transfizierten Zellen (Kapitel 3.2.1) wurden aus der -80 °C Lagerung entnommen und das Kryoröhrchen unter sterilen Bedingungen entlüftet. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig im Wasserbad bei 37 °C angetaut, resuspendiert und langsam in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit raumtemperaturwarmen RenaLife™-Medium mit Zusätzen gegeben. Nach spätestens 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel zum Entfernen von Resten des Cryo-SFM Mediums. Die anschließende Kultivierung der SV40-transformierten hRPTECs erfolgte auf 75 cm<sup>2</sup> CellBind®-Flaschen ohne Beschichtung. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu wurde das Medium für maximal 20 Minuten auf 37 °C temperiert. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 80/95 mmHg kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90 bis 95 % wurden die Zellen passagiert. Dies erfolgte in der Regel zweimal pro Woche. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml 1xDPBS (ohne Magnesium und Calcium) gewaschen. Durch Zugabe von 5 ml Accutase® und einer Inkubation bei 37 °C für 5 Minuten wurden die Zellen abgelöst. Nach dreifachem Abspülen der Oberfläche und Resuspendieren der Zellen wurden diese in 50 ml Falcons überführt und die Accutase®-Reaktion durch Zugabe von 45 ml Medium mit Zusätzen abgestoppt. Nach dem Pelletieren der Zellen mittels einer 8 Minuten Zentrifugation bei 1200 upm und 4 °C wurde das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl im CASY® *Cell Counter* bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension zu 10 ml CASYton-Puffer gegeben. Für die Stammhaltung wurden anschließend 1,5 bis 2 Millionen Zellen pro 75 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesät. Für die

Experimente wurden je 1,6 Millionen Zellen pro 75 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesät. Es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Zellmorphologie unter dem Lichtmikroskop.

### 3.2.3 Behandlung von hRPTECs mit TGF- $\beta$ 1 und HSA

1,6 Millionen hRPTECs in Passage 3 bis 13 wurden pro 75 cm<sup>2</sup>-Flasche ausgesät (Kapitel 3.2.2) und vor der Behandlung für 14 Tage in RenaLife<sup>TM</sup>-Medium mit Zusätzen kultiviert. Die Konfluenz wurde dabei nach vier Tagen erreicht. 24 Stunden vor Behandlung wurde das Medium durch RenaLife<sup>TM</sup>-Medium ohne Zusätze ersetzt, um einen Zellzyklusarrest herbeizuführen. Zum Start der Behandlung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1xDPBS (mit Magnesium und Calcium) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden mit 20 ml TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) oder humanes Serumalbumin (HSA, 20 mg/ml) in Medium ohne Zusätze bei 37 °C behandelt. Als Kontrolle dienten 20 ml Medium ohne Zusätze und Substanz. Nach 48 Stunden wurde die Zellviabilität bestimmt (siehe 3.2.4) und die Zellen für die RNA-Isolation lysiert und bei -80 °C gelagert (Kapitel 3.4). Das Medium wurde für 15 Minuten bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert und unmittelbar für eine miRNA- und Exosomenisolation verwendet (Kapitel 3.3.1).

### 3.2.4 Bestimmung der Zytotoxizität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde der Lactatdehydrogenase (LDH)-Test zur Quantifizierung abgestorbener Zellen verwendet, bei dem die Menge des durch sterbende Zellen freigesetzten Proteins LDH im Zellkulturmedium bestimmt wird. Eine Quantifizierung von LDH im Überstand durch Messung der Absorption bei 490 nm ist ein direktes Maß für die Zytotoxizität. Für den LDH-Test wurde das *Cytotoxicity Detection Kit* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden für die LDH-Gebrauchslösung Reagenz 1 und 2 in einem Verhältnis von 1:50 gemischt. Das Zellkulturmedium wurde von den Zellen abgenommen und je 100  $\mu$ L mit 100  $\mu$ L der LDH-Gebrauchslösung in einer klaren, flachen 96-Loch-Platte gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation unter lichtgeschützten Bedingungen erfolgte eine Absorptionsmessung bei 490 nm im *Cytation Image Reader*. Der LDH-Test wurde dem Resazurin-Test vorgezogen, wenn die Zellen mit HSA behandelt wurden, da das Albumin mit der Messung von Resazurin interferiert.



### 3.3 Exosomen-Isolation und Quantifizierung

Sowohl mit Urin als auch Zellkulturmedium wurde eine EV-Isolation und Quantifizierung durchgeführt. Während die Exosomenisolation aus Urin sowohl durch das *miRCURY<sup>®</sup> Exosome Isolation Kit* als auch die Größenausschlusschromatographie (qEV-Säulen) erfolgte, wurden Exosomen aus Zellkulturmedium ausschließlich durch das *miRCURY<sup>®</sup> Exosomen Isolation Kit* isoliert. Vor der EV-Isolation wurde der Urin und das Zellkulturmedium für 5 und 15 Minuten bei 3000 g und 4 °C und anschließend bei 10 Minuten bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert, um Zellen, Zelldebris und apoptotische Körperchen zu entfernen. Volumina über 2 ml (Zellkulturmedium) wurden mittels Ultrafiltration konzentriert (Kapitel 3.3.1).

#### 3.3.1 Einengen von Zellkulturmedium und Urin mittels Ultrafiltration

Die Ultrafiltration wurde verwendet, um Urin und Zellkulturüberstände für die nachfolgende Exosomenisolation einzuengen. Hierbei werden Urinkomponenten einschließlich EVs mit einer Größe von mindestens 10 kDa konzentriert, während kleinere Bestandteile und Flüssigkeit zum Teil entfernt werden. 2 ml Urin wurden dabei auf 500 µL, 80 ml des Zellkulturmediums auf 9 ml eingengt. Verwendet wurden hierzu Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 oder Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten. Die Filter sind mit einer Ultracel-Membran mit geringer Bindungsaffinität gegenüber biologischen Proben und einer Molekülgewicht-basierte Abscheidegrenze von 10kDa versehen. Die Ultrafiltration wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden die Filtereinheiten durch Zugabe von 4 ml oder 15 ml sterilfiltriertem PBS und Zentrifugation bei 4000 g und 20 °C für 15 Minuten äquilibriert. Nach vollständiger Entnahme des PBS wurden 2 ml oder 15 ml Probe zugegeben und 15 Minuten bei 4000 g und 20 °C zentrifugiert. Das Retentat wurde aus dem Filter entnommen und die Membran einmal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde entnommen, mit dem Retentat vereinigt, und für die Exosomenisolation verwendet.

#### 3.3.2 Isolation von Exosomen mit dem *miRCURY<sup>®</sup> Exosome Isolation Kit*

Die Isolation der Exosomen aus Urin und Zellkulturmedium unter Verwendung des *miRCURY<sup>®</sup> Exosome Isolation Kits* erfolgte nach Herstellerangaben. 9 ml konzentrierten Zellkulturmediums (Kapitel 3.3.1) oder 1 ml Urin wurden dabei mit 400 µl Präzipitationspuffer B pro Milliliter gemischt. Die Präzipitation erfolgte durch

Inkubation bei 4 °C für eine (Urin) oder zwei Stunden (Zellkulturmedium). Die Exosomen wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 3200 g (15 ml Falcons) oder 10000 g (2 ml Eppendorf-Gefäße) pelletiert. Im Falle einer RNA-Isolation wurde das EV-Pellet direkt in 700 µL QIAzol®-Puffer aufgenommen, bei einer Verwendung für den Westernblot erfolgte direkt die Lyse durch Zugabe von 160 µL RIPA-Puffer.

### 3.3.3 Isolation von Exosomen durch Größenausschlusschromatographie

Je 1 ml Urin pro Tier wurde mittels Ultrafiltrationseinheiten auf ein Volumen von 0,5 ml eingengt (Kapitel 3.3.1). Gegebenenfalls wurde der konzentrierte Urin mit PBS auf 0,5 ml aufgefüllt. Für die Exosomenisolation durch eine SEC wurden entsprechend den Herstellerangaben qEV-Säulen zunächst 10 Minuten auf Raumtemperatur gebracht und anschließend mit 12 ml PBS gewaschen, welches zuvor mittels eines 0,22 µm Filters sterilfiltriert wurde. Währenddessen wurden 500 µL konzentrierter Urin für 5 Minuten auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurde der Urin auf die Säulen gegeben. Als Laufpuffer wurde filtriertes PBS verwendet. Die Elution wurde in Fraktionen von 500 µL gesammelt und sofort auf Eis gelagert. Nach vollständiger Elution wurden die Säulen mit 10 ml PBS und 10 ml Ethanol (20 % in PBS) gewaschen und anschließend bei 4 °C gelagert. Für die RNA-Isolation wurden die Säulen nur einmal verwendet, um Kontaminationen zwischen Isolationen auszuschließen. Die exosomenangereichen Fraktionen 7 bis 9 wurden direkt im Anschluss für die RNA-Isolation vereinigt oder einzeln für die Western Blot-Analyse verwendet.

### 3.3.4 Semi-Quantifizierung und Charakterisierung mittels Western Blot

Eine Charakterisierung und semi-quantitative Bestimmung von Exosomen aus Urin und Zellkulturmedium erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Dabei werden Proteine nach ihrer Größe in einem Gel aufgetrennt und mittels proteinspezifischer Antikörper visualisiert. Die Intensität einer proteinspezifischen Bande gibt Aufschluss über die Präsenz und die Menge eines Proteins in einer biologischen Probe. Für den Western Blot wurde das EV-Pellet (Kapitel 3.3.2) in 160 µL kaltem RIPA-Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren aufgenommen. Wurden die EVs mittels SEC isoliert (Kapitel 3.3.3), wurden 100 µL einer SEC-Fraktion mit 60 µL RIPA-Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren gemischt. Die Lyse erfolgte durch Inkubation auf Eis für 30 Minuten und Durchmischen der Probe alle 5 Minuten. Nach der Lyse wurde der Gesamtproteingehalt mit dem *Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay* bestimmt. Dieser

Test basiert auf der kolorimetrischen Detektion und Quantifizierung von Proteinen durch Bicinchoninsäure (BCA)-Komplexbildung, welche durch Absorptionsmessung bei 562 nm quantifiziert werden kann. Die Quantifizierung der Probe erfolgt anhand einer Standardkurve unter Verwendung von bovinem Serumalbumin. Der Test wurde entsprechend den Herstellerangaben mit einem unverdünnten Probenvolumen von 25 µL durchgeführt. Die Messung erfolgte im SPECTRAMax Plus Photometer.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proben für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt und 1 Minute bei 16000 g zentrifugiert. 16,25 µL Überstand wurden mit 2,5 µL *Bolt<sup>®</sup> Sample Reducing Agent* (10x) und 6,25 µL *Bolt<sup>®</sup> Sample Buffer* (4x) pro Kammer auf NuPage<sup>®</sup> Bis/Tris-Gele (12 %) aufgetragen und unter Verwendung des *Bolt<sup>®</sup> MES-SDS-Laufpuffer* (20x) und des *Bolt<sup>®</sup> Antioxidans* im Mini Gel Tank aufgetrennt. Als chromogene und Chemilumineszenz-Laufkontrollen wurden der Standard *SeeBlue<sup>®</sup> Plus 2* und der Standard *MagicMark<sup>™</sup>* verwendet. Die Trennung erfolgte für 1 Stunde bei 150 Volt. Der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gels auf eine PVDF-Membran erfolgte unter Verwendung des *iBlot<sup>®</sup> Gel Transfer Stacks* (PVDF) im *iBlot<sup>®</sup> Gel Transfer Device* für 8 Minuten. Für die Antikörperfärbung wurde das *WesternBreeze<sup>™</sup> Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit* (anti-Rabbit) verwendet. Für die primäre Antikörperfärbung über 16 Stunden wurden die Antikörper *Rabbit monoclonal [EPR15314] to ALIX - N-terminal*, *Rabbit monoclonal [EPR7130(B)] to TSG101* und *Rabbit polyclonal to Calnexin* in der Verdünnung 1:1000 verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte im *ChemiDoc<sup>™</sup> Touch Imaging System*. Für die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes pro Probe wurde die *SimplyBlue<sup>™</sup> SafeStain*-Lösung verwendet, welche auf der Färbung von Proteinen durch das sequenzunspezifische Anlagern von Coomassie-Brilliant-Blau an die basischen Seitenketten der Aminosäuren beruht. Alle Kits und Reagenzien wurden nach Herstellerangaben angewandt.

Die densitometrische Analyse der Banden erfolgte in der ImageLab Software. Die dabei ermittelten Intensitäten wurden auf den auf den Western Blot aufgetragenen Gesamtproteingehalt normalisiert. Dies berücksichtigt die Variationen im aufgetragenen Volumen, während der Elektrophorese und während des Transfers von Gel auf PVDF-Membran.

### 3.4 RNA-Isolation, Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Die Isolation von RNA ab einer Länge von etwa 200 Nukleotiden einschließlich mRNA erfolgte über das *RNeasy Mini Kit*. Die Isolation von Gesamt-RNA ab einer Länge von

etwa 18 Nukleotide inklusive miRNA erfolgte mittels des *miRNeasy Mini Kits*. Im *miRNeasy Mini Kit* werden die gleichen Silica-Säulen verwendet wie im *RNeasy Mini Kit*, allerdings werden durch höhere Ethanol- und Salzkonzentrationen auch kleine RNA-Spezies unter 200 Nukleotide isoliert. Es wurden beide Kits verwendet, da die Isolationseffizienz größerer RNA-Moleküle durch das *RNeasy Kit* weniger effizient ist als die des *RNeasy Kits* (Eldh et al. 2012). Die Wahl des Isolationskits wurde auf die jeweilige Analyse abgestimmt.

### 3.4.1 RNA Isolation aus Gewebehomogenat

Die Homogenisierung von Gewebe erfolgte durch Zugabe des RLT-Lysepuffer und Zerkleinerung in einer Schwingmühle. Hierzu wurde tiefgefrorenes Gewebe auf Trockeneis zerkleinert, eine definierte Menge an abgewogen (siehe Tabelle 8) und in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß mit 1 ml Lysepuffer versetzt. Für die Homogenisierung von Niere und Herz wurde der RLT-Puffer mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet, für Lebergewebe der QIAzol<sup>®</sup>-Lysepuffer. Nach Zugabe von zwei 0,5 mm Edelstahlkugeln erfolgte die Zerkleinerung für sechs oder zehn Minuten in der Schwingmühle MM200 (siehe Tabelle 7). Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 16000 g wurde der Überstand unter Verwendung der QiaShredder-Säulen entsprechend den Herstellerangaben zusätzlich homogenisiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 16100 upm für 2 Minuten wurde der resultierende Überstand für die RNA-Isolation verwendet.

**TABELLE 8: SPEZIFIKATIONEN FÜR DIE RNA ISOLATION AUS GEWEBEHOMOGENAT**

Gewebe	Menge [mg]	Volumen Lyse-Puffer [ml]	Parameter Schwingmühle	Gewebe RNA-Isolation [mg]
<b>Niere</b> (Polkappe)	70	1 ml (RLT)	2x 3 min bei 30/s	15
<b>Herz</b> (Linker Ventrikel)	30	1 ml (RLT)	10 min bei 30/s	30
<b>Leber</b>	65	1 ml (QIAzol <sup>®</sup> )	2x 3 min bei 30/s	7

Die anschließende RNA-Isolation aus Nieren- und Leberhomogenaten erfolgte mittels des *RNeasy Mini Kits*. Dazu wurden 15 mg (Niere) oder 7 mg (Leber) Gewebehomogenat mit RLT-Lysepuffer (+1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) auf 350  $\mu$ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 350  $\mu$ l Ethanol (70 %) und Mischen mit der Pipette wurde die Probe auf die Mini-Säulen des Kits gegeben. Die weitere Aufreinigung einschließlich DNase-Verdau für 15 Minuten erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 60  $\mu$ l

RNase-freiem Wasser eluiert. Für die Isolation von RNA aus Herzhomogenaten wurde das *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* einschließlich Proteinase K (20 mg/ml) und dem *RNase-Free DNase Set* verwendet. Dabei wurden 30 mg Gewebehomogenat mit RLT-Lysepuffer (+1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) auf 450  $\mu$ L aufgefüllt. Nach Zugabe von 885  $\mu$ L RNase-freiem Wasser und 15  $\mu$ L Proteinase K folgte ein Proteinverdau durch Inkubation bei 55 °C für 10 Minuten. Nach Zentrifugation für 3 Minuten bei 10000 g wurde der Überstand (ca. 1,3 ml) mit 650  $\mu$ L Ethanol (100%) versetzt, mittels Pipette gemischt und auf die Mini-Säulen gegeben. Die weitere Aufarbeitung einschließlich DNase-Verdau für 15 Minuten erfolgte nach Herstellerangaben. Die RNA wurde ebenfalls in 60  $\mu$ L eluiert. Die resultierende RNA wurde mittels NanoDrop<sup>TM</sup> und Bioanalyzer quantifiziert, hinsichtlich ihrer Integrität geprüft (Kapitel 3.4.6) und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### **3.4.2 Isolation von Gesamt-RNA inklusive miRNA aus Gewebehomogenat**

Gesamt-RNA inklusive miRNA wurde aus Gewebehomogenaten in RLT-Puffer mit dem *miRNeasy Mini Kit* isoliert. Hierzu wurde das Protokoll des Herstellers modifiziert, indem 10 mg des mittels QiaShredder Säulen homogenisierten Nierengewebes (Kapitel 3.4.1) mit RLT-Lysepuffer (+1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) auf 150  $\mu$ L aufgefüllt und mit dem fünffachen Volumen QIAzol<sup>®</sup>-Puffer (700  $\mu$ L) gemischt wurde. QIAzol<sup>®</sup> ist ein Phenol/Guanidin-basierte Lyseagenz, welches sich nach Zugabe von Chloroform zu der Probe und einer Zentrifugation in drei Phasen trennt. In der wässrigen Phase ist die RNA, in der Interphase ist die DNA, und in der unteren, organischen Phase sind die Proteine enthalten. Für die RNA-Isolation wurde lediglich die wässrige Phase verwendet. Da die DNA durch dieses Verfahren entfernt werden kann, wird auf einen DNase-Verdau bei diesem Vorgehen verzichtet. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 2,5 fmol des Oligonukleotids cel-miR-39-3p als „*Spike-in*“ zur Kontrolle der Isolationseffizienz zu der wässrigen Phase zugesetzt. Anschließend wurden 140  $\mu$ L Chloroform zugegeben und für 15 Sekunden gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 15 Minuten wurde die obere Phase mit dem 1,5-fachen Volumen Ethanol (100 %) gemischt und auf die Silica-Säulen gegeben. Das weitere Vorgehen entsprach den Herstellerangaben. Die RNA einschließlich miRNA wurde in 50  $\mu$ L RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.4.3 Isolation von RNA aus Zelllysate mit dem RNeasy Kit

Vor der Isolation von RNA-Spezies ab etwa 200 Nukleotiden aus Zellen wurde zunächst das Medium vom Zellrasen entfernt und die Zellen mit 10 ml DPBS (mit Magnesium und Chlorid) gewaschen. Anschließend wurden pro 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche 5 ml und pro 6-Well 1 ml RLT-Lysepuffer (+1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde durch fünfmaliges Ziehen durch eine 21G-Kanüle homogenisiert und in ein 5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Das Zelllysate wurde direkt für die RNA-Isolation verwendet oder zur späteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur RNA-Isolation wurde das Zelllysate auf Eis aufgetaut, durch QiaShredder-Säulen nach Herstellerangaben ein zweites Mal homogenisiert und Zelldebris durch Zentrifugation bei 16100 upm für 2 Minuten entfernt. 860  $\mu$ L des resultierenden Überstands wurden mit dem gleichen Volumen Ethanol (70 %) gemischt und auf die Mini-Säulen des *RNeasy Mini Kits* gegeben. Die weitere Aufreinigung einschließlich einem DNase-Verdau für 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 50  $\mu$ L RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.4.4 Isolation von Gesamt-RNA inklusive miRNA aus Zelllysate

Für die Isolation von Gesamt-RNA inklusive miRNA aus Zellen wurde das Zellmedium vom Zellrasen entfernt und die Zellen mit 10 ml 1x DPBS (mit Magnesium und Chlorid) gewaschen. Anschließend wurden 5 ml oder 1 ml QIAzol<sup>®</sup>-Lysereagenz pro 75 cm<sup>2</sup>-Flasche oder 6-Well zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Homogenisierung mittels Pipette wurde das Lysate in Eppendorf-Gefäße überführt und für 1 Minute gemischt. Das Lysate wurde direkt für die RNA-Isolation verwendet oder zur späteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Isolation der gesamten RNA einschließlich miRNA erfolgte über das *miRNeasy Mini Kit*. Hierzu wurden 700  $\mu$ L QIAzol<sup>®</sup>-Lysate 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2,5 fmol des Oligonukleotids cel-miR-39-3p als „*Spike-in*“ zur Kontrolle der Isolationseffizienz und 140  $\mu$ L Chloroform (100 %) zugegeben und für 15 Minuten gemischt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000 g und 4 °C. Die resultierende wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit dem 1,5-fachen Volumen Ethanol (100 %) versetzt. Anschließend wurde die Probe auf die Mini-Säulen gegeben und die RNA nach

Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde in 40 µL RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

#### **3.4.5 Isolation von Gesamt-RNA inklusive miRNA aus Gesamturin, Zellkulturmedium oder Exosomen**

Die Isolation von Gesamt-RNA einschließlich miRNA aus Urin- oder Zellkulturmedium-Exosomen sowie aus Gesamturin erfolgte durch das *miRNeasy Mini Kit*. Vor der Isolation wurde der Urin 5 Minuten bei 3000 g und 10 Minuten bei 16 000 g und 4 °C zentrifugiert. Zellkulturmedium wurde 15 Minuten bei 3000 g und 10 Minuten bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Exosomen wurden anschließend entsprechend Kapitel 3.3 isoliert. Für die RNA-Isolation wurden 200 µL Urin oder Zellkulturmedium oder das aus dem *miRCURY® Exosome Isolation Kit* resultierende Exosomenpellet mit 700 µL QIAzol®-Lysereagenz versetzt. Alternativ wurden 500 µL Exosomen-Eluat aus der SEC mit dem 3,5-fachen Volumen (1150 µL) QIAzol®-Lysereagenz versetzt. Die Proben wurden für 5 Sekunden unter Mischen lysiert. Nach Mischen und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 2,5 fmol des Oligonukleotids cel-miR-39-3p als „*Spike-in*“ zur Kontrolle der Isolationseffizienz zugegeben. Anschließend wurden die Proben mit 140 µL Chloroform versetzt und für 15 Sekunden gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 15 Minuten wurde die obere Phase mit dem 1,5-fachen Volumen Ethanol (100 %) gemischt und auf die Silica-Säulen gegeben. Das weitere Vorgehen entsprach den Herstellerangaben. Die Elution erfolgte in 50 µL RNase-freiem Wasser. Das Eluat wurde dabei ein zweites Mal auf die Säule gegeben und anschließend bei -80 °C gelagert. Alternativ zur *miRNeasy Mini Kit*-basierten Isolation von EV-miRNA aus Urin wurde in dieser Arbeit das *miRCURY® RNA Isolation Kit – Cell & Plant* verwendet. Dabei wurde das Exosomenpellet (Kapitel 3.3.2) in 350 µL Lysepuffer aufgenommen und die RNA entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde in 50 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Dieses Kit wurde aufgrund der Übernahme von Exiqon A/S durch Qiagen 2018 vom Markt genommen, weshalb für spätere Arbeiten das *miRNeasy Mini Kit* verwendet wurde. Die Bestimmung der Isolationseffizienz anhand von zwei ausgewählten miRNAs und dem *Spike-in* cel-miR-39-3p bestätigt dabei die Gleichwertigkeit der beiden Kits in der miRNA-Isolation mit anschließender qRT-PCR basierter Quantifizierung (Anhang-Abbildung 27).

### 3.4.6 Bestimmung von RNA Konzentration, Reinheit und Integrität

Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA einschließlich miRNA erfolgte photometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm und durch Berechnung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  im NanoDrop™ 2000. Eine hohe  $OD_{280}$  basiert auf der Präsenz aromatischer Aminosäuren und lässt somit auf Proteinkontaminationen schließen. Ein Quotient von 1,8 bis 2 zeigt eine RNA-Probe mit geringen bis kaum vorhandenen Proteinkontaminationen an. Die Integrität von mRNA wurde mittels des *RNA 6000 Nano Kits* im 2100 Bioanalyzer bestimmt. Diese Methode basiert auf einer automatisierten Gelelektrophorese, bei der die RNA-Spezies in einem Mikrokanal nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes werden die dabei entstehenden Gelbanden detektierbar gemacht, die Größe der RNA-Spezies mittels eines internen Standards bestimmt und die RNA-Menge der Probe bestimmt. Beim *RNA 6000 Nano Kit* wird aus den Banden das Verhältnis aus den ribosomalen RNAs 28S zu 18S, die sogenannte *RNA Integrity Number* (RIN), abgeleitet. Eine RIN von 9 bis 10 zeigt eine RNA mit hoher Integrität, eine niedrige RIN eine potenzielle degradierte RNA an. Eine Quantifizierung von miRNAs aus Urin oder Zellkulturmedium ist aufgrund der geringen Konzentration im NanoDrop™ 2000 nicht möglich. MiRNA-Isolationen wurden daher mittels des *Small RNA Chip* im 2100 Bioanalyzer quantifiziert, welcher speziell für RNA-Spezies zwischen sechs und 150 Nukleotide entwickelt wurde und auf dem gleichen Messprinzip beruht wie das *RNA 6000 Nano Kit*.

### 3.5 Quantitative qRT-PCR

Die sogenannte quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) dient zum Nachweis und zur Quantifizierung von RNA. Hierbei wird die RNA zunächst sequenzunabhängig durch eine reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die reverse Transkriptase wird anschließend durch kurze Erhitzung, zum Beispiel durch fünfminütige Inkubation bei 85 °C oder 95 °C, inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wird danach in der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) durch eine thermostabile DNA-Polymerase und DNA-sequenzspezifische Primer in mehreren Zyklen vervielfältigt. Während jedem Zyklus wird dabei zunächst der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95 °C in DNA-Einzelstränge getrennt. Anschließend wird die Temperatur gesenkt, um die Primer-Hybridisierung und die davon ausgehende



DNA-Synthese durch eine Polymerase zu ermöglichen. Am Ende eines jeden Zyklus wird die DNA quantifiziert. Hierfür können Fluoreszenzfarbstoffe, welche sich in die DNA einlagern können und dabei ihre Fluoreszenz erhöhen, oder spezielle Sonden (Kapitel 3.5.2) verwendet werden. In beiden Fällen ist die Gesamtfluoreszenz am Ende eines Zyklus proportional zur Menge des PCR-Produktes und zur vorhandenen cDNA. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz das erste Mal signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird Schwellenwertzyklus, oder auch  $C_T$ -Wert (engl. *cycle threshold*) genannt.

### 3.5.1 Reverse Transkription und Taqman<sup>®</sup>-basierte qRT-PCR von mRNA

mRNAs wurden mittels der Taqman<sup>®</sup>-basierten qPCR quantifiziert. Bei dieser Technologie erfolgt die reverse Transkription unter Verwendung von RNA-sequenzunspezifischen zufälligen Primer (engl. *Random Primers*) sowie der MultiScribe<sup>™</sup> Reversen Transkriptase. Für die reverse Transkription wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* ohne Verwendung von RNase-Inhibitoren nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Ansatz wurde wie in Tabelle 9 gezeigt hergestellt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

**Tabelle 9: Reverse Transkription und Taqman<sup>®</sup>-basierte qRT-PCR von mRNA**

Reverse Transkription		
	Volumen [ $\mu$ L]	Programm
10x Reverse Transcription Buffer	5	1. 10 min bei 25 °C 2. 2 h bei 37 °C 3. 5 min bei 85 °C 4. Dauerhaft 4 °C
25x dNTPs	2	
10x Random Primers	5	
MultiScribe <sup>™</sup> Reverse Transcriptase	2,5	
(50 Einheiten/ $\mu$ L)	10,5	
Wasser (RNase-frei)	25 (400 ng)	
RNA		
qRT-PCR		
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Master Mix (2x)	5	1. 2 min bei 50 °C 2. 10 min bei 95 °C 3. 15 sec bei 95 °C → 1 min bei 60 °C (40 Zyklen)
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assay (20x)	0,5	
Wasser (RNase-frei)	3,4	
cDNA (20 ng/ $\mu$ L)	1,1	

Die Besonderheit der anschließenden Taqman<sup>®</sup>-basierten qPCR ist die Verwendung von sogenannten Taqman<sup>®</sup> Hydrolysesonden, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM<sup>™</sup>) am 5'-Ende und einem nichtfluoreszierenden *Quencher* (NFQ) am 3'-Ende versehen sind. Im Rahmen der qPCR wird im ersten Schritt die Temperatur auf 95 °C erhöht und die doppelsträngige DNA denaturiert. In dieser Phase wird die Fluoreszenz

des Fluoreszenzfarbstoffs der Sonde durch direkte Nachbarschaft zum *Quencher* unterdrückt. Nach Senkung der Temperatur auf 60 °C erfolgt die Hybridisierung der Primer und der Sonde an die einzelsträngige cDNA. Durch eine spezifische Taq-Polymerase mit integrierter 5'-Endonukleaseaktivität wird anschließend der komplementäre DNA Strang synthetisiert. Erreicht die Polymerase die Sonde, wird der Fluoreszenzfarbstoff abgespalten und freigesetzt. Durch die räumliche Distanz von Farbstoff und *Quencher* steigt die Fluoreszenz im qPCR-Ansatz an. Die Freisetzung ist dabei direkt proportional zur synthetisierten DNA-Menge. Die qRT-PCR erfolgte in 384-Well Platten im *Viiia™ 7 Real-Time PCR*-Gerät unter Verwendung des *TaqMan® Gene Expression Master Mix* und genspezifischer *TaqMan® Gene Expression Assays* nach Herstellerangaben. Die PCR-Reaktion wurde nach Tabelle 9 angesetzt, auf die Platte gegeben, mit einem *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* versiegelt und für 1 Minute bei 1400 upm zentrifugiert. Die Quantifizierung erfolgte über das in Tabelle 9 dargestellte dreistufige Programm. Als passive interne Referenz wurde der Farbstoff ROX™ aus dem *TaqMan® Gene Expression Master Mix* verwendet.

### 3.5.2 LNA™-Technologie basierte reverse Transkription und SYBR®-Green basierte qRT-PCR von miRNA

miRNAs in Flüssigkeiten und Gewebehomogenaten wurden mittels des *miRCURY® LNA™ PCR* Systems quantifiziert. Dabei wird die miRNA unabhängig von ihrer Sequenz zunächst mit einem Poly-A-Schwanz versehen und anschließend durch einen universellen cDNA Primer im Rahmen der reversen Transkription amplifiziert. Als Qualitätskontrolle wird ein synthetischer RNA-*Spike in* (UniSp6) zugesetzt. Für die reverse Transkription wurde ein definiertes Volumen RNA, 3 µL für die zeitgleiche Detektion mehrerer miRNAs auf Panels und 2 µL für die Detektion einzelner miRNAs pro 10 µL Reverse Transkription-Reaktion, verwendet. Die resultierende cDNA wurde 1:40 (Panel) oder 1:20 (einzelne miRNAs) verdünnt (siehe Tabelle 10).

Die Quantifizierung mittels qPCR wurde in 384-Well-Platten durchgeführt. Es wurden entweder individualisierte *miRCURY® LNA™ miRNA PCR Panels* mit 93 oder 374 miRNAs (Ratte) oder einzelne miRNA Primer verwendet. Die Panels wurden dabei benutzerdefiniert aus miRNAs zusammengestellt, welche basierend auf publizierten Daten eine basalen Expression in der Niere zeigen und teilweise im Kontext der Nierenphysiologie und Nierenpathologie als verändert beschrieben wurden. Die qPCR erfolgt unter Verwendung der *QuantiNova® DNA Polymerase* und von miRNA-spezifischen Primerpaaren, welche LNA™ (*Locked nucleic acids*) enthalten. Diese

modifizierten LNA<sup>TM</sup>-Nukleotide sind strukturell so entworfen, dass sich deren Hybridisierungseigenschaften und Affinität zur komplementären RNA-Sequenz erhöht. Nach Amplifikation der DNA kommt es am Ende eines jeden Zyklus zur Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR<sup>®</sup> Green in die doppelsträngige DNA, was eine DNA-Quantifizierung ermöglicht. Am Ende der qPCR wurde eine Schmelzkurve angefertigt. Hierbei wurde die Temperatur kontinuierlich von 56 °C auf 95 °C erhöht. Bei einer Temperatur spezifisch für das PCR-Produkt kommt es zur Dissoziation des DNA-Doppelstranges und der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup>-Green wird freigesetzt. Dies führt zu einer Absenkung der Fluoreszenzintensität. Zeigt die Schmelzkurve mehr als ein Signal deutet dies auf eine unspezifische Amplifikation von DNA oder Primerdimere hin. Als passive interne Referenz wurde der Farbstoff ROX zugesetzt. Als sogenannter „inter plate“-Kalibrator wurde UniSp3 verwendet, um die Effizienz der qRT-PCR zwischen verschiedenen Platten zu vergleichen. Als maximaler C<sub>t</sub>-Wert wurde nach Herstellerangaben Zyklus 37 gewählt. Bei Platten mit 93 miRNAs wurden technische Duplikate angefertigt, während bei den Platten mit 374 miRNAs eine Einzelbestimmung erfolgte. Bei der Quantifizierung einzelner miRNAs wurden technische Triplikate angefertigt. Für die Mengenangaben der Komponenten sowie die Temperaturbedingungen während der Amplifikation der reversen Transkription und qRT-PCR siehe Tabelle 10.

**Tabelle 10: LNA<sup>TM</sup>-Technologie basierte reverse Transkription und SYBR<sup>®</sup>-Green basierte qRT-PCR von miRNA (Panel)**

Reverse Transkription		
	Volumen [µL]	Programm
5x Reaktionspuffer	2	1. 1h bei 60 °C (Qiagen) oder 42 °C (Exiqon)
Nuklease-freies Wasser	4,5 (3,5)	
Enzym-Mix	1	2. 5 min bei 95 °C 3. Dauerhaft 4 °C
Synthetisches RNA <i>Spike in</i> (UniSp6) RNA (1:20 oder 1:40)	0,5 2 (3)	
qRT-PCR		
miRCURY <sup>®</sup> LNA <sup>TM</sup> SYBR <sup>®</sup> PCR Mastermix	5 1	1. 2 min bei 95 °C 2. 10 sec bei 95 °C → 1 min bei 56 °C (Qiagen) oder 60 °C (Exiqon) (40 Zyklen) 3. Schmelzkurve
miRCURY <sup>®</sup> LNA <sup>TM</sup> miRNA PCR Assay cDNA (1:20) mit ROX (125nM)	4	

Für die LNA<sup>TM</sup>-basierte qRT-qPCR wurden zunächst das *Universal cDNA Synthesis Kit II* und das *ExiLENT SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix Kit* der Firma Exiqon verwendet, welche im Oktober 2017 von Qiagen übernommen wurde. Die Kits wurden anschließend unter den Namen *miRCURY<sup>®</sup> LNA<sup>TM</sup> RT Kit* und *miRCURY<sup>®</sup> LNA<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> PCR Kit* geführt und für diese Arbeit verwendet. Lediglich eine geringe Adjustierung in dem

Temperaturprogramm (Tabelle 10) wurde bei der Übernahme vorgenommen, die restlichen Parameter und Komponenten der Kits blieben unverändert.

### 3.5.3 Auswertung der qRT-PCR

Für die Normalisierung von miRNAs in Gewebe und Zellen wurde die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode gewählt. Für biologische Flüssigkeiten einschließlich Urin und Zellkulturmedium hingegen gibt es bislang noch keinen Consensus bezüglich der optimalen Normalisierungsmethode. Dies ist unter anderem darin begründet, dass in biologischen Flüssigkeiten bislang keine über verschiedene Bedingungen stabil exprimierte, endogene Referenzgene oder miRNAs identifiziert und validiert werden konnten (Kapitel 1.4.3) und die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode so nicht verwendet werden kann. Daher wurden für Flüssigkeiten verschiedene Methoden gewählt und verglichen.

#### **Relative Quantifizierung von mRNA und miRNA in Gewebe und Zellen mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode:**

Bei der sogenannten  $\Delta\Delta Ct$ -Methode wird die mittlere Menge der m(i)RNA eines Zielgenes auf die mittlere Menge eines Referenzgenes normalisiert, welches konstant im untersuchten Gewebe exprimiert wird. Anschließend erfolgt eine Normalisierung des Zielgenes in der behandelten Gruppe auf die Kontrollgruppe (siehe Formel 1). Das relative Expressionslevel gibt das relative Mengenverhältnis von Behandlung zu Kontrolle an, wobei ein Wert kleiner 1 eine Reduktion, und ein Wert größer 1 ein Anstieg der Genexpression in der Behandlungsgruppe verglichen zur Kontrolle bedeutet.

#### **FORMEL 1:**

$$\Delta\Delta Ct = (Ct(Gen) - Ct(Referenz))_{Behandelt} - (Ct(Gen) - Ct(Referenz))_{Kontrolle}$$

$$Relatives\ Expressionslevel = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Als Referenzgen für mRNA im Gesamtgewebe oder Zellen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Als Referenz für miRNA wurde die kleine nukleäre RNA U6, ein konstant exprimierter Bestandteil des Spleißosoms, verwendet.

**Relative Quantifizierung von miRNA in Urin und Zellkulturmedium mit Spike-in Normalisierung:**

Zur Kontrolle der technischen Variabilität während RNA-Isolation und RT-qPCR wurde das synthetische Oligonukleotid cel-miR-39-3p als *Spike in*-Kontrolle zugesetzt (Kapitel 3.4). Bei der relativen Quantifizierung durch *Spike in*-Normalisierung wird auf dieses Oligonukleotid normalisiert (siehe Formel 2). Bei Urinproben erfolgte zusätzlich eine anschließende Normalisierung auf den Kreatiningehalt im Urin (UCrea) der Probe.

**FORMEL 2:**

$$\Delta Ct = 2^{-(Ct(Probe) - Ct(cel-miR-39-3p))} / UCrea$$

Zur Berechnung des relativen Verhältnisses zwischen Behandlung und Kontrolle wurde das Verhältnis der Ziel-m(i)RNA und cel-miR-39-3p der Behandlungsgruppe auf den geometrischen Mittelwert der Verhältnisse der biologischen Replikate der Kontrollgruppe bezogen.

**Relative Quantifizierung von miRNA in Urin und Zellkulturmedium mit der modifizierten  $\Delta Ct$ -Normalisierung (Urin, CCM):**

Bei der modifizierten  $\Delta Ct$ -Methode handelt es sich um eine Modifikation der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Hierbei wird nicht auf eine endogene oder synthetische Referenz normalisiert, sondern ein maximaler  $C_t$ -Wert festgelegt (Pavkovic et al. 2014). Für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *miRCURY<sup>®</sup> LNA<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> PCR Kit* wird vom Hersteller ein maximaler  $C_t$  von 37 angegeben.  $C_t$ -Werte über 37 wurden auf 37 gesetzt.

**FORMEL 3:**

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{(37 - Ct)} / UCrea$$

Die Berechnung wurde nach Formel 3 durchgeführt. Urinproben wurden zusätzlich auf die entsprechenden Kreatininwerte normalisiert, während dies für Zellkulturmedium entfiel. Zur Berechnung des relativen Verhältnisses wurde der  $\Delta Ct$  der Behandlungsgruppe auf den geometrischen Mittelwert aus den biologischen Replikaten der Kontrollgruppe bezogen.

**Relative Quantifizierung von miRNA im Urin mit der Globaler Mittelwert-Normalisierung:**

Die Normalisierung auf den globalen Mittelwert wurde von Mestdagh und Kollegen eingeführt (Mestdagh et al. 2009). Die Globaler Mittelwert-Normalisierung kann unter

den Voraussetzungen durchgeführt werden, dass eine Vielzahl an miRNAs pro Probe gemessen wurden und die meisten der gemessenen miRNAs keinen Behandlungseffekt zeigen. Bislang gibt es noch keinen Konsensus bezüglich der Mindestanzahl an detektierten miRNAs pro Probe. Diese Methode wurde daher ausschließlich für die Normalisierung von miRNAs im Rahmen des Profiling verwendet, bei dem pro Probe 374 miRNAs detektiert wurden. Dies wird als ausreichend für diese Art der Normalisierung angesehen.

**FORMEL 4**

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct(miRNA) - Ct(globaler Mittelwert))} / UCrea$$

Bei der Globaler Mittelwert-Normalisierung werden zunächst alle miRNAs mit einem  $C_t$  größer 37 aus dem Datensatz entfernt. Anschließend wird der arithmetische Mittelwert aller restlichen miRNAs pro Probe gebildet. Der Mittelwert wird von den einzelnen miRNAs der Probe nach Formel 4 abgezogen. Das Ergebnis für Urinproben wird zuletzt auf den entsprechenden Kreatiningehalt des Urins normalisiert. Zur Berechnung des relativen Verhältnisses wurde der  $\Delta Ct$  der Behandlungsgruppe auf den geometrischen Mittelwert aus den biologischen Replikaten der Kontrollgruppe bezogen.

**Statistische Analyse und Identifikation signifikant deregulierter miRNA:**

In allen Versuchen wurde der maximale  $C_t$  Wert entsprechend der Herstellerangaben auf 37 Zyklen festgesetzt. MiRNAs, welche in über 50 % der gemessenen Proben  $C_t$ -Werte über 37 zeigten, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die restlichen miRNAs wurden nach den oben beschriebenen Methoden ausgewertet und mittels der Genedata Software und GraphPad Prism 8 Software statistischen Tests unterzogen. Wurden zwei Proben oder Zeitpunkte hinsichtlich der Signifikanz potenzieller Effekte untersucht, wurde ein multipler t-Test einschließlich Korrektur mittels *False discovery rate* (FDR) durchgeführt. Für die Analyse von mehr als zwei Proben wurde je nach zugrundeliegendem Datensatz eine zweifache Varianzanalyse (Kapitel 3.8.3) einschließlich Korrektur mittels FDR durchgeführt. Eine Effektgröße von mindestens 2 (Urin, Zellkulturmedium) oder 1,5 (Zellen) und ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als ein signifikanter Effekt gewertet.

### 3.6 miRNA-Quantifizierung im Gewebe mithilfe der Nanostring®-Plattform

Zusätzlich zur qPCR wurden miRNAs im Nierengewebe durch die Nanostring®-Plattform quantifiziert. Hierzu wurde *das nCounter® Rat v1.5 miRNA Gene Expression Panel* mit insgesamt 420 miRNAs verwendet. Die Nanostring®-Technologie basiert auf der Hybridisierung der Ziel-miRNA mit einer spezifischen *Capture*- und einer Reporter-Sonde. Die *Capture*-Sonde trägt dabei ein 3'-Biotin-Label. Die Reporter-Sonde ist am 5'-Ende mit einem Barcode bestehend aus sechs komplementären RNA-Segmenten versehen. Diese RNA-Segmente sind mit je einem aus vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Abfolge der Fluoreszenzfarbstoff-Modifikationen ist dabei spezifisch für die Ziel-RNA. Zunächst wird nun die Probe mit den Reportersonden gemischt und es erfolgt eine Hybridisierung der beiden, wenn die Sequenz komplementär ist. Entstandene Hybride werden anschließend isoliert und über das Biotin-Label der *Capture*-Sonden auf einer Oberfläche immobilisiert. Eine Quantifizierung erfolgt durch Detektion der Barcodes mittels eines automatisierten Fluoreszenzmikroskops. Die Detektion und Quantifizierung wurde nach Herstellerangaben von Dr. Mira Pavkovic und Kollegen durchgeführt. Die Detektionsgrenze wurde auf 20 Counts gesetzt. Die absoluten miRNA Mengen wurden auf den Mittelwert der vier Referenzgenen  $\beta$ 2-Mikroglobulin (B2m), GAPDH, Rezeptor-like Protein 19 (Rlp19) und  $\beta$ -Aktin (Actb) normalisiert. Anschließend wurde die relative Expression zwischen Krankheitsmodell und Kontrolle berechnet und mit einem multiplen t-Test einschließlich Kontrolle durch die FDR auf statistische Signifikanz getestet. Ein Effekt von mindestens zweifach wurde als signifikant eingestuft.

### 3.7 Funktionelle Annotation von miRNAs und Ziel-mRNA Vorhersage

Signifikant veränderte miRNAs wurden anhand einer manuellen Literaturrecherche (Pubmed, Google Scholar) sowie mithilfe der IPA-Software und der TAM 2.0 Webapplikation (Li et al. 2018a) annotiert. Zum einem wurden die miRNAs in IPA einer sogenannten *Core Analysis* unterzogen. Die IPA-Software ist eine webbasierte Applikation zur Analyse, Integration und Interpretation von Genexpressions- und Proteom-Analysedaten. Die Daten werden hierzu in Form von relativen Mengen beziehungsweise Verhältnissen in das Programm geladen, wobei zuvor Mittelwerte der biologischen und technischen Replikate berechnet wurden. Bei der *Core Analyse* werden ausgehend von einer internen Datenbank, der *Ingenuity Knowledge Base*, übergeordnete Regulatoren wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, beeinflusste

Signalwege sowie biologische und toxikologische Funktionen der Gene und miRNAs in dem zu analysierenden Datensatz identifiziert. Die Ergebnisse wurden dabei auf experimentell beobachtete Beziehungen von miRNAs zu den vorhergesagten Parametern beschränkt. Für die Interpretation der Core Analyse wurde der Fokus auf die Vorhersage von sogenannten Bio- und Tox-Funktionen gelegt. Diese Parameter geben eine Vorhersage darüber, welche Effekte die Genexpressions- oder miRNA-Veränderungen mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit, ausgedrückt in Form eines p-Wertes, auf physiologische und pathologische Prozesse im Organismus haben können. Zusätzlich wurden durch Verwenden des sogenannten *MicroRNA Target Filters* in IPA mRNAs vorhergesagt, die von den deregulierten miRNAs potenziell gebunden und somit abgebaut werden könnten. Diese Vorhersage kann die möglichen Effekte der miRNAs auf die Genexpression exponierter Zellen identifizieren. Die identifizierten mRNAs wurden im Folgenden einer erneuten Core Analyse (*vide supra*) unterzogen. Alle Ergebnisse wurden dabei auf experimentell beobachtete Beziehungen oder Beziehungen mit hoher Wahrscheinlichkeit von mRNAs zu den vorhergesagten Parametern, auf das Organ Niere und die Spezies Ratte beschränkt.

### **3.8 Mikroarray-basierte Genexpressionsanalysen**

Mikroarrays werden zur Quantifizierung der Expression einer großen Anzahl an Genen in Geweben oder Zellen verwendet. Genexpression wird hierbei anhand des m(i)RNA-Levels bestimmt, welches die Transkriptionsrate der Gene widerspiegelt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Affymetrix-Chips werden die m(i)RNA Level quantifiziert, indem sie sequenzabhängig an 25 Nukelotiden lange, komplementäre Oligonukleotide auf die Oberfläche der Arrays binden. Ein Gen wird hierbei meist durch mehrere Oligonukleotide repräsentiert, welche verschiedene Abschnitte der Gensequenz abbilden. Die hier verwendeten Clariom™ D-Chips für Ratten enthalten über 214.000 Transkripte.

#### **3.8.1 Bestimmung der Genexpression in Gewebehomogenaten mittels Mikroarrays**

Im Rahmen der Mikroarray-basierten Genexpressionsanalyse wurde zunächst die RNA aus dem untersuchten Gewebe oder Zellen isoliert (Kapitel 3.4) und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, bei der ein T7-Promotor in das cDNA Produkt eingebaut wird. In der anschließenden *in vitro*-Transkription (IVT) wird die cDNA



ausgehend vom T7-Promotor in amplifizierte RNA (aRNA) umgeschrieben, wobei Biotin-markierte Nukleotide in die aRNA eingebaut werden. Es folgt eine erneute reverse Transkription, diesmal in einzelsträngige cDNA. Nach anschließender Fragmentierung der cDNA werden die RNA-Fragmente an die Oligonukleotide des Affymetrix-Chips hybridisiert. Die Detektion erfolgt über den Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin, welches über Streptavidin an die Biotin-modifizierten Nukleotide der aus der aRNA synthetisierten cDNA bindet. Die Prozessierung der RNA für die Mikroarray-Hybridisierung erfolgte mittels des *GeneChip® WT Plus Kits*. Die Durchführung sowie die Kriterien bei der Qualitätskontrolle richteten sich bei allen Schritten nach den Angaben des Herstellers.

### Reverse Transkription

Im Rahmen der reversen Transkription wurde die RNA mit Primern versehen, welche eine T7 Promotorsequenz enthält. Die resultierende einzelsträngige cDNA besitzt eine T7-Promotorsequenz am 5'-Ende. In einem zweiten Schritt wurde der komplementäre Strang synthetisiert, sodass eine doppelsträngige cDNA entsteht. In die in Tabelle 11 beschriebene Reaktion wurden 100 ng RNA eingesetzt. Es wurde ausschließlich RNA mit einer A260/280 Ratio von 1,7 bis 2,1 und einer RIN von über 8,5 verwendet. Zur RNA wurden eine PolyA-Kontrolle (1:100000 Verdünnung der Stammlösung) zugesetzt. Die Poly-A Kontrolle dient als Kontrolle des späteren Labeling-Schrittes (Kapitel 3.8.2). Parallel zu den Proben wurde zur Qualitätskontrolle eine Kontroll-RNA aus dem Kit (1 mg/ml total-RNA aus HeLa Zellen) mitgeführt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

**Tabelle 11: Reverse Transkription für Mikroarrays**

Einzelstrang-Synthese	Doppelstrang-Synthese
3 µL RNA + 2 µL Poly-A Kontrolle + 4 µL <i>First-strand</i> Puffer + 1 µL <i>First-strand</i> Enzym	10 µL Einzelstrang-cDNA + 18 µL <i>Second-strand</i> Puffer + 2 µL <i>Second-strand</i> Enzym
1. 1 h bei 25 °C 2. 1 h bei 42 °C 3. 10 min bei 4 °C	1. 1 h bei 16 °C 2. 10 min bei 65 °C 3. 10 min bei 4 °C

### *in vitro*-Transkription und zweite reverse Transkription

Während der anschließenden *in vitro*-Transkription wurde aus der doppelsträngigen cDNA die komplementäre RNA (cRNA) synthetisiert und diese mittels der T7 RNA-Polymerase amplifiziert. Der entsprechende Mastermix (Tabelle 12) wurde bei

Raumtemperatur angesetzt. Das Produkt der Doppelstrangsynthese wurde vor Zugabe für 5 Minuten auf Raumtemperatur gebracht.

Anschließend wurde die cRNA mittels magnetischen *Purification beads* gereinigt, um Enzyme, Salze, anorganische Phosphate und nicht eingebaute Nukleotide der vorherigen Syntheseschritte zu entfernen. Unter Verwendung eines *Magnet Stands* wurden die RNA dreimal mit Ethanol (80% in Wasser) gewaschen und anschließend in 65 °C warmen, RNase-freiem Wasser eluiert. Die Qualität der RNA wurde mittels des *RNA6000 Nano Kits* und dem *Nanodrop™* (Kapitel 3.4.6) bestimmt. Anschließend wurde diese RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und die restliche cRNA durch einen Verdau mit RNase H entfernt (Tabelle 11). Die cDNA wurde analog zur cRNA (*vide supra*) durch magnetische *Purification beads* gereinigt. Abweichend von der cRNA-Aufreinigung wurde hier Ethanol (100%) vor der Aufreinigung zugegeben. Die Qualität der DNA wurde erneut mittels *Nanodrop™* bestimmt.

**Tabelle 12: In vitro- und reverse Transkription für Mikroarrays**

<i>In vitro</i> Transkription – RNA Synthese	Reverse Transkription – DNA Synthese (I)
30 µL Doppelstrang-cDNA + 24 µL <i>IVT</i> Puffer + 6 µL <i>IVT</i> Enzym	24 µL cRNA (15µg) + 4 µL <i>2<sup>nd</sup>-Cycle</i> Primer
4. 16h bei 40 °C 5. Dauerhaft 4 °C	4. 5 min bei 70 °C 5. 5 min bei 25 °C 6. 2 min bei 4 °C
Reverse Transkription – DNA Synthese (II)	Hydrolyse mit RNase H
28 µL <i>2<sup>nd</sup>-Cycle</i> Ansatz + 8 µL <i>2<sup>nd</sup>-Cycle</i> ss-cDNA Puffer + 4 µL <i>2<sup>nd</sup>-Cycle</i> ss-cDNA Enzym	40 µL <i>2<sup>nd</sup>-Cycle</i> ss-cDNA Ansatz + 4 µL RNase H
6. 10 min bei 25 °C 7. 90 min bei 42 °C 8. 10 min bei 70 °C 9. 2 min bei 4 °C	7. 45 min bei 37 °C 8. 5 min bei 95 °C 9. 2 min bei 4 °C

### Fragmentierung und Hybridisierung

Vor der Hybridisierung der Proben auf den Chip wurde die cDNA durch die Enzyme Uracil-DNA-Glykosylase und Apurin/Apyrimidin-Endonuklease-1 an den in den vorherigen Schritten eingebauten dUTP Bereichen der DNA fragmentiert. Dadurch wird die Bindung der DNA an die immobilisierten Oligonukleotide des Mikroarray-Chips erhöht. Anschließend wurden die Fragmente durch die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase mit Biotin-konjugiertes Labelingreagenz markiert.

**Tabelle 13: Fragmentierung, Markierung und Hybridisierung der DNA für Mikroarrays**

Fragmentierung der cDNA	Markierung der cDNA
31.2 µL cDNA (5.5µg) + 10 µL RNase-freies Wasser + 4,8 µL 10x cDNA Fragmentation Buffer + 1 µL UDG (10 U/µL) + 1 µL APE1 (1 000 U/µL)	45 µL fragmentierte cDNA + 12 µL 5x TdT Puffer + 1 µL DNA Labeling Reagent (5mM) + 2 µL TdT (30 U/µL)
10. 1 h bei 37 °C 11. 2 min bei 93 °C 12. 2 min bei 4 °C	13. 1 h bei 37 °C 14. 10 min bei 70 °C 15. 2 min bei 4 °C
Hybridisierungsmix	
56,7 µL markierte, fragmentierte cDNA (5,2µg) + 3,7 µL Control Oligonucleotide B2 (3nM) + 11 µL 20x Hybridization Controls + 110 µL 2x Hybridization Mix + 15,4 µL DMSO + 19,9 µL RNase-freies Wasser	

Für die Hybridisierung wurden die Kits *GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit* und *GeneChip® Expression 3`-Amplification Reagents Hybridization Control Kit* verwendet. Die Reaktionsansätze sind in Tabelle 13 dargestellt.

Der Hybridisierungsmix wurde bei Raumtemperatur angesetzt. Die Hybridisierungskontrolle diente dabei zur Qualitätssicherung der Hybridisierung sowie Wasch- und Färbeschritte. Das B2 Kontroll-Oligo wird für die spätere Bildanalyse benötigt. Die Hybridisierung der fragmentierten cDNA auf die Oligonukleotide des Mikroarrays erfolgte nach Inkubation des Hybridisierungsmixes bei 99 °C und 45 °C für je 5 Minuten durch Befüllen der rattenspezifischen Clariom™ D-Chips mit dem Mix und Inkubation für 16 h bei 45 °C im Hybridisierungsofen bei 60 upm.

### Waschen, Färben und Scannen

Das Waschen, Färben und Scannen der hybridisierten Clariom™ D-Chips erfolgte an einer GeneChip® Flucidics Station 450 nach dem Protokoll „Prime\_450“. Hierfür wurde das *GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit* verwendet. Beim Färben wurde zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin gekoppeltes Streptavidin zugegeben. Ein zusätzlich verwendeter Antikörper mit Bindungsaffinität zu biotinyliertem Streptavidin verstärkt anschließend das Signal. Die Quantifizierung erfolgt im GeneChip® Scanner 3000, in dem ein Argon-Laser das Phycoerythrin anregt und die Emission bei 570 nm misst.

### 3.8.2 Qualitätskontrolle und Prozessierung der Genexpressionsdaten mittels Genedata

Die Qualitätskontrolle der Mikroarrays erfolgte mittels der *Transcriptome Analysis Console* (TAC) Software und der Genedata Software. In der TAC-Software wird die Effizienz des Biotin-Labeling und der Hybridisierung basierend auf den in den jeweiligen Schritten verwendeten Kontrollen überprüft. Bei der *Labeling*-Kontrolle wird ein Poly-A RNA Mix aus verschiedenen synthetisch hergestellten *B.subtilis* Genen (*lys*, *phe*, *thr*, und *dap*) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Diese Kontrollen durchlaufen parallel zu den Proben den gesamten Prozess der IVT, reversen Transkription, Hydrolyse sowie Fragmentierung und Markierung der DNA und dienen als interne Kontrollgene. Diese vier Gene müssen auf den Chips ihren Konzentrationen entsprechenden Intensitäten detektiert werden. Die Hybridisierungskontrolle besteht aus AFFX-r2-Ec-BioB, AFFX-r2-Ec-BioC, AFFX-r2-Ec-BioD und AFFX-r2-P1-Cre. Bei erfolgreicher Hybridisierung auf den Mikroarray-Chip erzeugen diese vier Oligonukleotide definierte, von ihrer Konzentration abhängige Signalintensitäten. Zusätzlich gibt eine Hauptkomponentenanalyse (HKA) Aufschluss über die Variabilität der gesamten Genexpression zwischen den Chips. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vom Hersteller empfohlenen Schwellenwerte für die Qualitätskontrolle verwendet. Die Rohdaten der Clariom™ D-Mikroarrays wurden mittels der Genedata-Software prozessiert. Die zentralen Schritte sind hierbei eine GCCC Normalisierung und SST Skalierung, eine Diagnose der Qualität, ein Kondensierungsschritt und die Berechnung eines Referenz-Chips. Wie bereits beschrieben wird auf Mikroarray-Chips ein Gen durch mehrere Oligonukleotide bestimmt. Bei der Kondensierung werden die Signalintensitäten pro Gen unter der Berücksichtigung der Hintergrundhybridisierung mittels des RMA-Algorithmus zusammengefasst. Dabei wird ein p-Wert berechnet, welcher die Wahrscheinlichkeit anzeigt, mit welcher ein Gen über das reine Hintergrundrauschen hinaus exprimiert ist. Es folgt eine Quantil-Normalisierung (Kapitel 3.8.3), bei der die Intensität aller Chips so normalisiert wird, dass die Chips untereinander vergleichbar sind. Technische Variabilität, welche zum Beispiel unterschiedliche mittlere Intensitäten der Chips unabhängig von der Expression einzelner Gene erzeugt, wird über diese Methode eliminiert. Zuletzt erfolgt noch die Berechnung eines virtuell bestimmten Referenzchips. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Genexpressionsprofile der hier verwendeten Tiermodellen mit publizierten Daten anderer Tiermodelle verglichen. Und dies zu ermöglichen, wurden Rohdaten für Mikroarray-basierten Genexpressionsprofilen für Glomerulonephritis-induzierte Nierenschäden (Pavkovic et al. 2015a), AA-induzierte Nierenschäden (Su et al. 2011)

und humaner DN (Woroniecka et al. 2011) von der Gene Omnibus Internetseite (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) heruntergeladen und mittels Genedata prozessiert. Die Publikationen von Pavkovic und Kollegen und Su und Kollegen basierten auf RAE230 2.0 Affymetrix Chips während für die Erhebung der Humandaten der Chip HG-U133A 2.0 verwendet wurde. Da es sich in beiden Fällen um ältere Mikroarray Chips handelt, wurde ein anderes Prozessierungsschema verwendet. Dabei wird keine GCCC Normalisierung und SST Skalierung durchgeführt und für die Kondensierung anstelle des RMA-Algorithmus der MAS 5.0-Algorithmus verwendet.

### **3.8.3 Statistische Analyse und Darstellung der Genexpressionsdaten**

Die statistische Auswertung und Darstellung der Genexpressionsdaten erfolgte in der Genedata Software. Hierzu wurde ein Schwellenwert von 20 angelegt. RNA welche mit einer geringeren Intensität detektiert wurden, wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen.

#### ***Box Plot-Darstellung und Quantil-Normalisierung***

Die Box Plot-Darstellung wurde verwendet, um die absoluten Genexpressionsdaten der einzelnen Proben visuell vergleichen zu können. Bei dieser Darstellung wird der Median aller Daten berechnet sowie der Bereich gekennzeichnet, in dem 50 % der Daten liegen. Während der Median innerhalb der Box liegt, zeigen die obere und die untere Abgrenzung das obere und untere Quantil an. An der Höhe der Box kann die Streuung im Datensatz abgelesen und zwischen den Proben verglichen werden. Die Varianz kann dabei auf technische Abweichungen zum Beispiel während dem Labeling oder auf verschiedene RNA-Konzentrationen zurückgeführt werden. Um diese Varianz zu eliminieren, wurden die Daten einer Quantil-Normalisierung unterzogen. Bei der Normalisierung werden unter der Annahme, dass die Verteilung der Genexpression in den Proben in etwa gleich ist und ein Großteil der Gene zwischen den getesteten Bedingungen unverändert sind, die Quantile einschließlich Median zwischen den Proben angeglichen. Diese Art der Normalisierung wird häufig in Mikroarray-Studien verwendet. Dabei wurde beachtet, dass für jeden verwendeten Datensatz eine eigene Quantil-Normalisierung durchgeführt wird, da eine gemeinsame Normalisierung von Daten, welche getrennt voneinander generiert wurden, zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen kann (Zhao et al. 2020c).

### **Hauptkomponentenanalyse**

Die HKA, englisch *principal component analysis* oder PCA, ist ein multivariantes statistisches Verfahren. Sie dient dazu die wichtigsten Informationen im Datensatz zu extrahieren und möglichst viele der darin enthaltenen Variablen zu sogenannten Hauptkomponenten (HK) zusammenzufassen. Die HKs werden dabei so gewählt, dass sie einen möglichst großen Teil der Varianz im Datensatz erklären. Dargestellt wird das Ergebnis in einem dreidimensionalen Raum, wobei die drei Dimensionen die drei wichtigsten HK darstellen. Desto näher die einzelnen Proben in diesem dreidimensionalen Raum beieinander liegen, desto ähnlicher sind die zugrundeliegenden Genexpressionsprofile.

### **Statistische Auswertung**

Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der Welch-Test, eine modifizierte Variante des t-Tests, verwendet. Der Welch-Test ist eine statistische Methode, bei der vergleichbar zum t-Test untersucht wird, ob die Unterschiede zwischen zwei Gruppen statistisch signifikant sind. Der Welch-Test wurde dem t-Test bei der Auswertung der Genexpressionsdaten vorgezogen, da bei Mikroarray-Experimenten meistens nicht von einer gleicher Varianz in allen Datensätzen ausgegangen werden kann und daher der normale t-Test nicht verwendet werden sollte. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde parallel der für Mikroarrays entwickelte limma-moderated t-Test durchgeführt, welcher die identische Gruppe deregulierter Gene identifizierte. Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen und auf Signifikanz der Genexpressionsänderungen geprüft, wurde die Varianzanalyse (englisch: *n-way Analysis of variance*, oder n-way Anova) verwendet. Die Varianzanalyse ist ein statistisches Verfahren, bei dem untersucht wird ob Effekte mehrerer Parameter in mehr als zwei Gruppen signifikant sind. Geprüft wird hierbei, ob die Varianz innerhalb einer Gruppe kleiner ist als die Varianz zwischen den analysierten Gruppen. Ähnlich zum p-Wert des Welch- oder t-Test gibt der resultierende Benjamini-Hochberg (BH) q-Wert ein Maß für die Signifikanz der beobachteten Effekte zwischen den Gruppen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor allem die zweifache Varianzanalyse (2-way Anova) verwendet, bei dem die Parameter „behandelt“ beziehungsweise „fettleibig“ oder „gesunde Kontrolle“ und „Alter“ analysiert wurden. Für die Annotationen der Genexpressionsprofile in den hier analysierten Tiermodellen wurden Schwellenwerte von  $p \leq 0,001$  (Welch-Test) und  $BH-q \leq 0,005$  (Anova) gewählt.

### ***Berechnung von Effektgrößen***

Nach Bestimmung der statistischen Signifikanz zwischen zwei oder mehr Gruppen wurde für die signifikant veränderten Gene eine relative Datennormalisierung, das heißt eine Berechnung der Größe der Unterschiede, durchgeführt. Hierzu wurde unter Verwendung der absoluten Werte das Verhältnis zwischen der Genexpression in der Gruppe der behandelten oder kranken Tiere und der Genexpression in der entsprechenden Kontrolle berechnet. Ein relatives Verhältnis von 0,5 bedeutet eine Reduktion der Genexpression in der einen Gruppe verglichen zur Kontrolle um 50%. Ein relatives Verhältnis von 2 bedeutet eine zweifach höhere Genexpression relativ zur Kontrolle. Ein relatives Verhältnis  $\geq 1,7$  wurde als relevant betrachtet.

### ***Hierarchische Clusteranalyse und Heatmap-Darstellung***

Nach statistischer Analyse wurde die Genexpression einer hierarchischen Clusteranalyse, auch hierarchischem Clustering genannt, unterzogen. Bei dieser Analyse wird die Ähnlichkeit von Genexpressionsprofilen bestimmt. Gene mit einem sehr ähnlichen relativen Verhältnis werden in räumlicher Nähe dargestellt, während Gene mit unterschiedlichen Profilen in den analysierten Proben weiter voneinander entfernt liegen. Die Berechnung basierte in dieser Arbeit auf der Berechnung der euklidischen Entfernung. Das Ergebnis wurde in Form von sogenannten Heatmaps (englisch für „Hitzekarten“) dargestellt, der die zuvor berechneten relativen Verhältnisse der einzelnen Gene zugrunde liegen. Gene mit einem relativen Verhältnis über 1 werden in rot dargestellt, während ein relatives Verhältnis zwischen 0 und 1 in grün dargestellt wird. Durch die Kombination der Heatmap-Darstellung mit einer hierarchischen Clusteranalyse werden Gene mit einem ähnlichen Expressionsprofil und relativen Verhältnis direkt untereinander angezeigt, während Gene mit unterschiedlichen Profilen und relativen Verhältnissen und weiter auseinanderliegenden Bereichen der Heatmap dargestellt werden.

#### **3.8.4 Interpretation der Genexpressionsprofile**

Für die Interpretation der Genexpressionsprofile wurden neben einer manuellen Literaturrecherche mit den Suchmaschinen PubMed, Google und Google Scholar verschiedene bioinformatische Analyseprogramme wie der IPA-Software und der TXG-MAPr Webapplikation verwendet.

Die Hintergründe der IPA-Software wurden bereits in Kapitel 3.7 erläutert. Für die Analyse der Genexpressionsprofile wurde im Rahmen der Core Analyse zusätzlich zu den Bio- und Tox-Funktionen übergeordnete Regulatoren wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren vorhergesagt, welche verantwortlich für die im Datensatz beobachteten Genexpressionsveränderungen sein könnten. Zudem wurden Signalwege aus den Genexpressionsdaten abgeleitet, die basierend auf den Genexpressionsdaten mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit  $p$  aktiviert oder inhibiert sind. Hierzu wurde der Aktivierungswert  $z$  berechnet, wobei ein negativer Wert eine Inhibition bedeutet und ein positiver Wert eine Aktivierung.

Die TXG-MAPr (englisch: *toxicogenomic module association with pathogenesis*) Webapplikation wurde verwendet, um die Genexpressionsdaten einer sogenannten Analyse des gewichteten Korrelationsnetzwerks, in Englisch „*weighted gene co-expression network analysis*“ (WGCNA) zu unterziehen. Die WGCNA ist eine bioinformatische Analysemethode, bei der Gene entsprechend ihrer Ko-Expression in sogenannte Module oder Netzwerke zusammengefasst werden (Liang et al. 2020). Häufig werden dadurch Gene in einem Modul zusammengefasst, welche eine ähnliche biologische Funktion erfüllen. Dargestellt werden diese Module durch eine hierarchische Clusteranalyse und den Parameter EGS (englisch: *Eigengene score*). Der EGS wird berechnet indem für alle Gene eines Moduls eine HKA durchgeführt wird. Die erste HK, die die größte Variabilität innerhalb des Moduls beschreibt, wird als repräsentative Darstellung des zugrundeliegenden Genexpressionsprofiles, als sogenannter EGS-Score, verwendet. In der TXG-MAPr Webapplikation wurde die WGNCA verwendet, um für Genexpressionsdaten bekannter Nieren- und Lebertoxine Module zu berechnen. Diese Module wurden anschließend mit histopathologischen Befunden korreliert, welche in den dazugehörigen Studien beobachtet wurden (Sutherland et al. 2018). Zur Analyse und Interpretation neuer Datensätze können diese in die TXG-MAPr Webapplikation hochgeladen werden. Der Vergleich des Datensatzes mit den durch Leber- und Nierentoxin-assoziierte Genexpression vordefinierten Modulen ermöglicht im Anschluss die biologische und toxikologische Interpretation und Identifikation zugrundeliegender Pathomechanismen im hochgeladenen Datensatz.



## 4. Ergebnisse

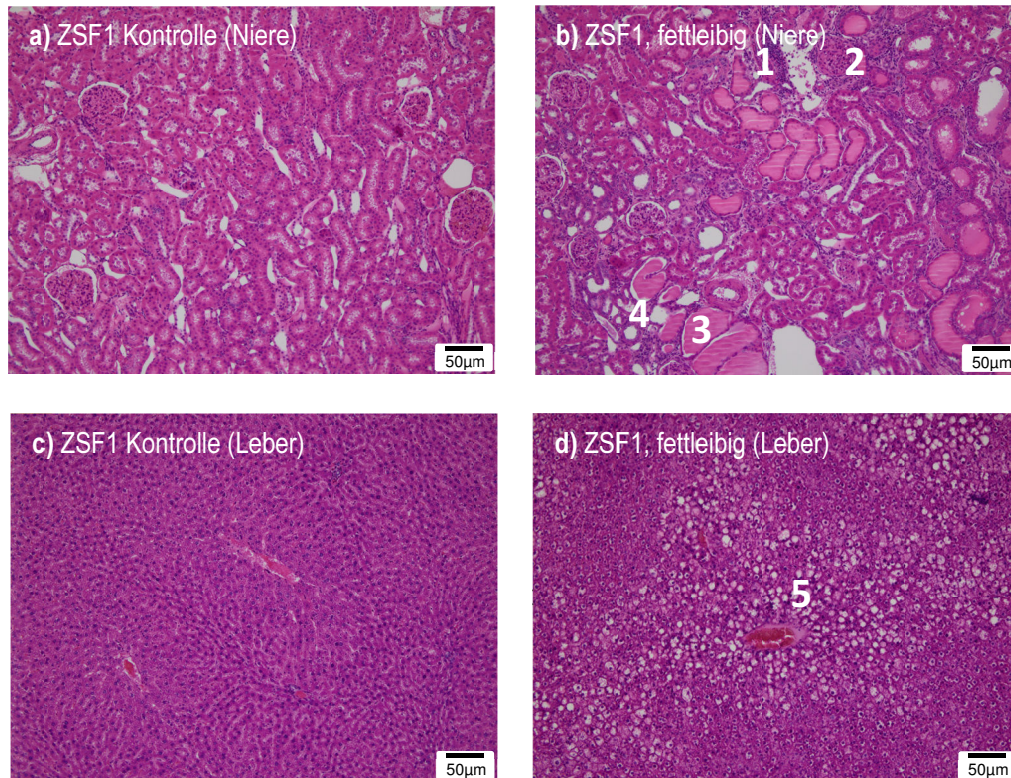
### 4.1 Histopathologische Analyse und klinisch-chemische Untersuchung

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Analyse von miRNAs im Urin als neue potenzielle Biomarker für CKD. Hierfür wurden ZSF1- und mRenTG-Ratten verwendet, bei denen es sich um häufig eingesetzte Tiermodelle für MetS- und DN-assoziierte, sowie Bluthochdruck-induzierte CKD handelt. MRenTG-Ratten, welche durch erhöhte Renin-Aktivität gekennzeichnet sind, wurden entweder mit dem ACE-Hemmer Captopril behandelt, um den Folgen der Reninüberexpression entgegenzuwirken, oder mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME behandelt, welcher schädliche Effekte der Renin-Überexpression einschließlich die CKD verstärkt (siehe auch Kapitel 3.1.2 und Abbildung 13). Um zu zeigen, dass Veränderungen der miRNAs in einem Zusammenhang mit ausgeprägter Nierenschädigung stehen, wurden der Grad und die Art der Nierenschädigung in beiden Tiermodellen mittels histopathologischer Analyse bestimmt. Des Weiteren wurden klassische Marker und neuere Proteinbiomarker für Nierenschädigung und Nierenfunktion im Urin beider Tiermodelle quantifiziert. Diese Daten sollen unter anderem zeigen, ob die potenziellen miRNA-Biomarker physiologische und pathophysiologische Veränderungen der Niere sensitiver anzeigen könnten als etablierte Biomarker. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die hier verwendeten Tiermodelle hinsichtlich ihrer Genexpression in weiteren Organen mit vermuteter zentraler Rolle in der Pathogenese zu charakterisieren. In fettleibigen ZSF1-Tieren ist dies die metabolisch aktive Leber, welche unter anderem zu einem veränderten Lipidstoffwechsel beitragen kann, während in mRenTG-Ratten vor allem das Herz durch den mechanischen Stress des Bluthochdruckes beeinflusst sein könnte. Daher wurden zusätzlich zur Niere in ZSF1-Ratten die Leber und in mRenTG-Ratten das Herz histopathologisch untersucht.

#### 4.1.1 Histopathologische Untersuchungen von Niere und Leber in ZSF1-Ratten

Zur Bestimmung der Art und des Grades der Organschädigung wurden Niere und Herz in 26 Wochen alte ZSF1-Ratten einer histopathologischen Untersuchung unterzogen. Repräsentative H&E-Färbungen der Niere und Leber sind in Abbildung 4 dargestellt. In der Niere von fettleibigen ZSF1-Ratten wurden eine Infiltration von mononukleären Zellen, Glomerulopathie sowie eine schwere tubuläre Schädigung einschließlich Tubulus-Dilatation, Proteinzyylinder und moderate bis schwere tubuläre Degeneration festgestellt (Abbildung 4b). Die Infiltration mononukleärer Zellen war dabei spezifisch

für das ZSF1-Rattenmodell und wurde nicht im mRenTG-Modell beobachtet (siehe 4.1.2). In den Nieren schlanker ZSF1-Kontrolltiere wurden keine histopathologischen Veränderungen beobachtet (Abbildung 4a). Die Veränderungen in fettleibigen, 26 Wochen alten ZSF1-Ratten entsprachen insgesamt einer ausgeprägten Nierenschädigung des Glomerulus und Tubulus mit paralleler renaler Entzündung.



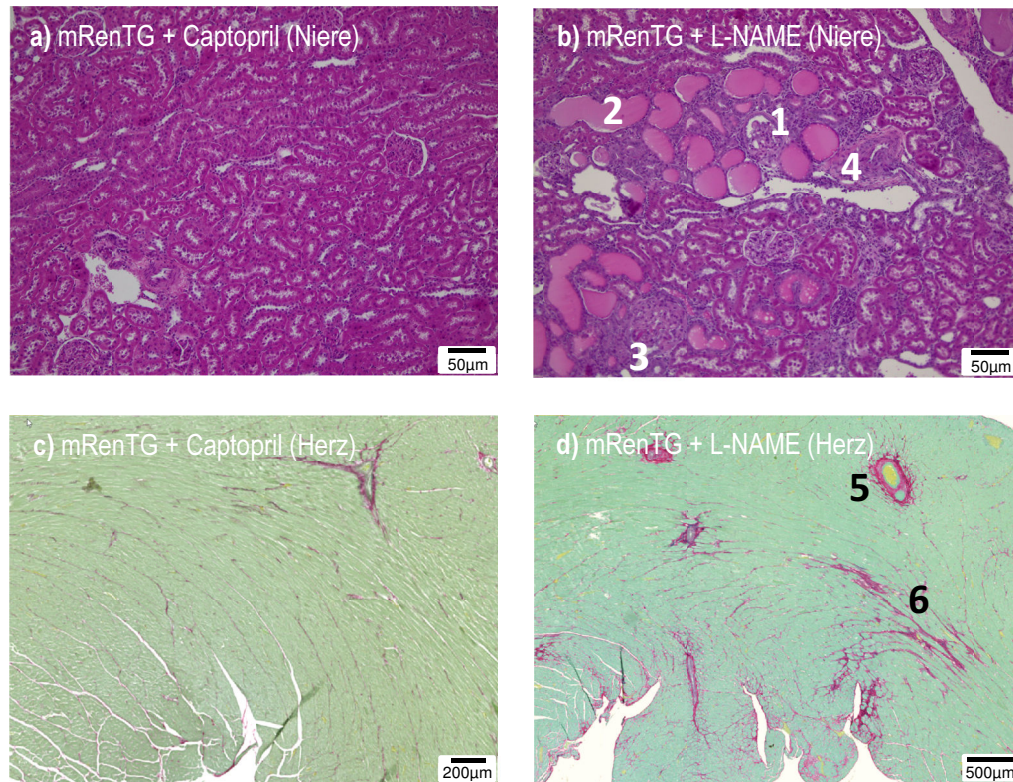
**ABBILDUNG 4: HISTOPATHOLOGISCHE BEFUNDE IN NIERE UND LEBER VON 26 WOCHEN ALTEN FETTLAIBIGEN UND SCHLANKEN ZSF1-RATTEN.**

Repräsentative FFPE-Gewebeschnitte nach H&E Färbung. a) Niere schlanker ZSF1-Kontrolltiere. b) Niere fettleibiger ZSF1-Ratten. c) Leber schlanker ZSF1-Kontrolltiere. d) Leber fettleibiger ZSF1-Ratten. 1 = Mononukleäres Zellinfiltrat. 2 = Glomerulopathie. 3 = Tubulus-Dilatation und Proteinzylinder. 4 = Moderate bis schwere tubuläre Degeneration. 5 = Moderate zentrilobuläre Vakuolisierung der Hepatozyten. Maßstab: 50 µm.

Die Leber fettleibiger ZSF1-Ratten zeigte eine moderate, zentrilobuläre Vakuolisierung der Hepatozyten sowie eine allgemeine hepatozelluläre Hypertrophie (Abbildung 4d). Diese oder andere histopathologischen Veränderungen konnten in den gesunden Kontrolltieren nicht beobachtet werden (Abbildung 4c). Die Befunde in 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten entsprachen dem Bild einer ausgeprägten Hepatosteatose, auch Fettleber genannt.

#### 4.1.2 Histopathologische Untersuchungen von Niere und Herz in mRenTG-Ratten

mRenTG-Ratten wurden nach achtwöchiger Behandlung mit Captopril (Kontrollgruppe) oder L-NAME (Krankheitsmodell) einer histopathologischen Untersuchung von Niere und Herz unterzogen.



**ABBILDUNG 5: HISTOPATHOLOGISCHE BEFUNDE IN NIERE UND HERZ VON mRENTG-RATTEN NACH ACHTWÖCHIGER BEHANDLUNG MIT CAPTOPRIL ODER L-NAME.**

Repräsentative FFPE-Gewebeschnitte nach H&E-Färbung (Niere) oder Sirius Red/Fast Green-Färbung (Herz). a) Niere von mRenTG-Ratten nach Captopril-Behandlung (30 mg/kg). b) Niere von mRenTG-Ratten nach Behandlung mit L-NAME (30 mg/L). c) Herz von mRenTG-Ratten nach Captopril-Behandlung. d) Herz von mRenTG-Ratten nach Behandlung mit L-NAME (30 mg/L). 1 = Schwere Glomerulopathie. 2 = Tubulus-Dilatation und Proteinzylinder. 3 = Moderate bis schwere tubuläre Degeneration. 4 = Proliferation glatter Muskelzellen, Vaskulopathie. 5 = Perivaskuläre Fibrose. 6 = Leichte bis moderate myokardiale Fibrose. Maßstab Niere: 50µm. Maßstab Herz: 200 µm (c) oder 500 µm (d). mRenTG: Maus Renin-2 transgene Ratten. L-NAME: N(ω)-nitro-L-Argininmethylester.

Während in Captopril-behandelten Ratten keine histologischen Auffälligkeiten beobachtet werden konnten (Abbildung 5a), zeigten die L-NAME behandelten mRenTG-Ratten sowohl eine deutliche Glomerulopathie als auch eine tubuläre Schädigung, welche unter anderem charakterisiert war durch Tubulus-Dilatationen, Proteinzylinder und moderate bis schwere tubuläre Degeneration (Abbildung 5b). Die Glomerulopathie war dabei ausgeprägter als in fettleibigen ZSF1-Ratten (siehe auch 4.1.1). Zusätzlich wurde eine Proliferation glatter Muskelzellen sowie Vaskulopathie



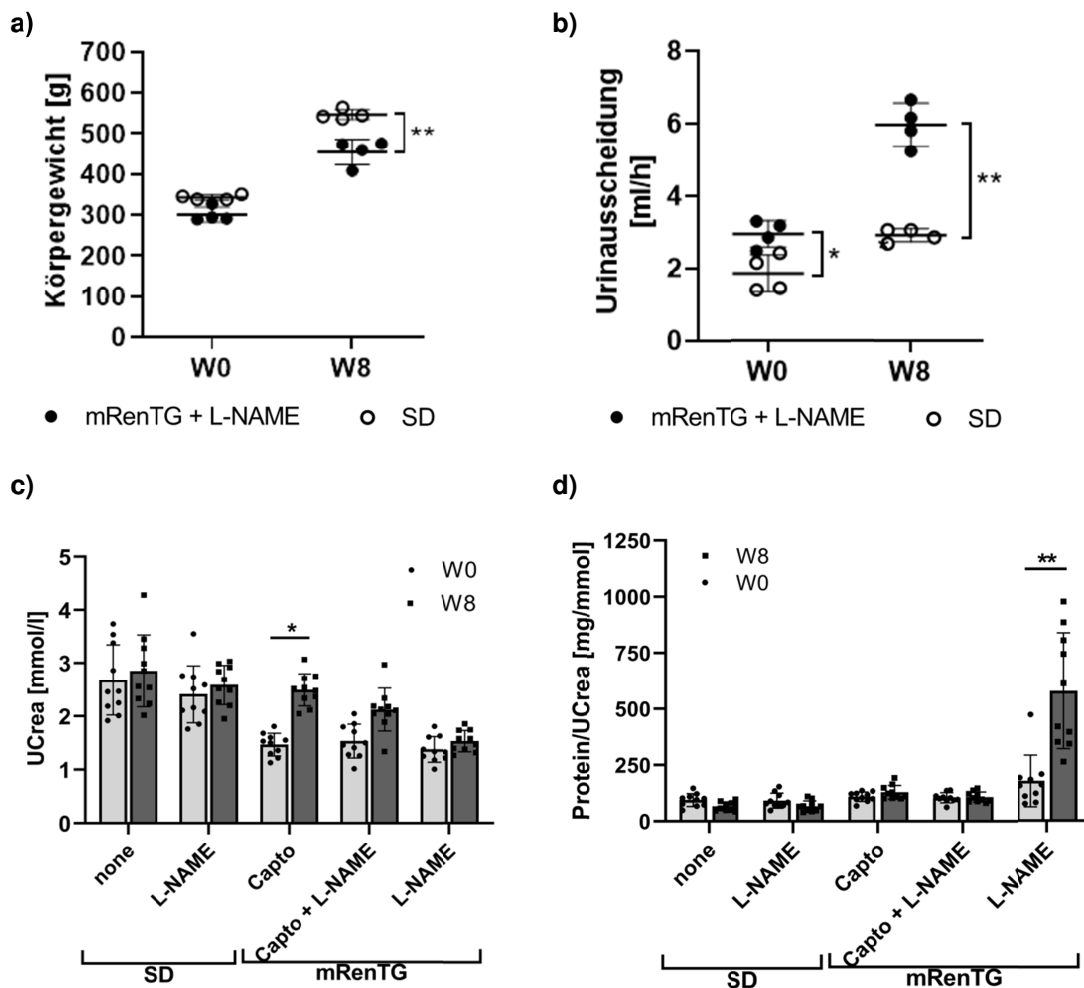
festgestellt, welche in den ZSF1-Tieren nicht beobachtet wurde. Zusammenfassend entsprachen diese Befunde einer ausgeprägten Schädigung der Glomeruli, des Tubulus-Systems und der renalen Blutgefäße im hypertensiven mRenTG-Tiermodell.

Pathologische Veränderungen im Herzen von mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME waren charakterisiert durch perivaskuläre und leichte bis moderate myokardiale Fibrose (Abbildung 5d). Diese Veränderungen waren in den Captopril-behandelten Kontrolltieren nicht erkennbar, welche eine gleichmäßige Struktur der intramuralen Gefäße und des Myokards zeigten (Abbildung 5c). Zusammenfassend entsprachen diese Befunde einer moderaten Fibrose des Herzens.

#### **4.1.3 Klassische und neuere Urin-Biomarker für Nierenschädigung**

Um eine potenzielle Beeinträchtigung der Nierenfunktion festzustellen und den Wert etablierter Biomarker mit neueren Biomarkerkandidaten zu vergleichen, wurden in 14, 22 und 26 Wochen alten ZSF1-Ratten und in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME oder Captopril klassische und neuere Urin-basierte Biomarker für Nierenschädigung und Nierenfunktion quantifiziert. Nach Behandlung mit L-NAME war das Körpergewicht von mRenTG-Ratten verglichen zur gleichaltrigen SD-Kontrollgruppe leicht aber signifikant reduziert (Abbildung 6a), während die Urinausscheidung über einen definierten Zeitraum signifikant auf das etwa Zweifache anstieg (Abbildung 6b). Keine relevanten Änderungen in diesen Parametern wurden für die andere untersuchten Gruppen (z.B. SD + L-NAME oder mRenTG + Captopril verglichen zu SD) identifiziert (Anhang-Tabelle 24). Als klassische Parameter der Nierenfunktion wurde der Gesamtproteingehalt im Urin relativ zur Kreatinin-Konzentration vor und nach der achtwöchigen Behandlungsphase bestimmt. Vor der Behandlung mit L-NAME war der Gesamtproteingehalt im Urin unbehauelter mRenTG-Ratten leicht erhöht verglichen mit Captopril-behandelten mRenTG-Tieren und unbehauelten SD-Ratten. Nach Induktion einer CKD durch achtwöchige Behandlung der mRenTG-Ratten mit L-NAME stieg der Gesamtproteingehalt weiter auf das etwa Vierfache an (Abbildung 6d). Keine relevanten Effekte konnten hingegen in SD-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME oder in mRenTG-Ratten nach Captopril-Behandlung identifiziert werden. Zusammenfassend zeigte der moderate Gewichtsverlust eine leichte generelle Toxizität der Reninüberexpression, nachdem diese mit einer eNOS-Inhibition durch L-NAME kombiniert wurde. Die erhöhte Urinausscheidung mit parallel erhöhtem Gesamtproteingehalt deutete auf eine

Schädigung der Niere einschließlich Polyurie in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger L-NAME Behandlung hin.

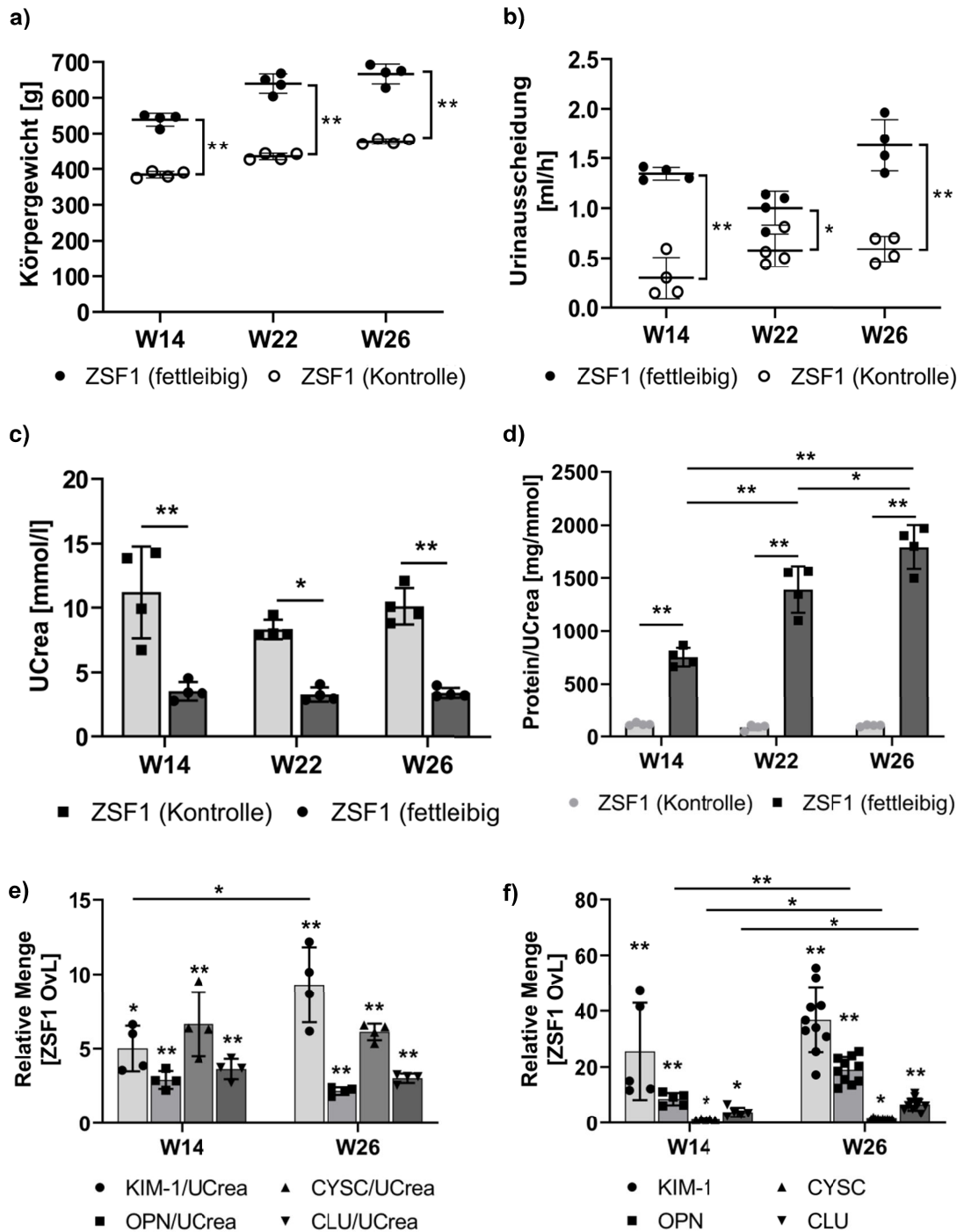


**ABBILDUNG 6: ENTWICKLUNG DES KÖRPERGEWICHT, DER URINAUSSCHIEDUNG, DER URIN-KREATININ-KONZENTRATION UND DES GESAMTPROTEINGEHALTES IN mRENTG-RATTEN ÜBER DIE STUDIENDAUER.**

a) Körpergewicht und b) Urinausscheidung von mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME (30 mg/kg) oder SD-Kontrollen (n=4). Urinausscheidung wurde in metabolischen Käfigen bestimmt und auf die Dauer der Urinkollektion in Stunden normalisiert. Quantifizierung von Kreatinin (c) und Gesamtprotein (d) im Urin von mRenTG-Ratten nach achtwöchiger L-NAME Behandlung (30 mg/kg) und SD-Kontrollen (n=10). Gesamtprotein wurde mit der Pyrogallol Rot-Methode quantifiziert und auf den Kreatiningehalt im Urin normalisiert. Statistische Signifikanz wurde mittels zweifachen ANOVA einschließlich Šídák's Test für multiple Vergleiche getestet. Statistische Signifikanz ist als \* $p \leq 0,05$  oder \*\* $p \leq 0,0005$  verglichen zur gleichaltrigen Kontrolle gezeigt. mRenTG: Maus Renin-transgen. SD: Sprague-Dawley-Ratte. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester. W: Woche.

In ZSF1-Ratten war das Körpergewicht in der als fettleibig definierten Gruppe bereits im Alter von 14 Wochen gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht und stieg mit zunehmenden Alter weiter an (Abbildung 7a). Parallel war zu allen Zeitpunkten die Urinproduktion in fettleibigen Tieren deutlich gegenüber den schlanken Kontrollen

erhöht (Abbildung 7b). Die Urinproduktion stieg allerdings in fettleibigen Ratten über den beobachteten Zeitraum nicht weiter an.



**ABBILDUNG 7: ENTWICKLUNG DES KÖRPERGEWICHT, DER URINPRODUKTION, DER URIN-KREATININ-KONZENTRATION, DES GESAMTPROTEINGEHALTES UND NEUERER PROTEIN-BIOMARKER FÜR NIERENSCHÄDEN IN ZSF1-RATTEN ÜBER DIE STUDIENDAUER.**

a) Körpergewicht und b) Urinausscheidung fettleibiger ZSF1-Ratten und schlanker ZSF1-Kontrolltiere (n=4). Urinausscheidung wurde in metabolischen Käfigen bestimmt und auf die Dauer der Urinkollektion in Stunden normalisiert. Quantifizierung von Kreatinin (c) und Gesamtprotein (d) im Urin von fettleibigen und schlanken 14, 22 und 26 Wochen alten ZSF1-Ratten (n=4). Gesamtprotein wurde mit der Pyrogallol Rot-Methode quantifiziert und auf den

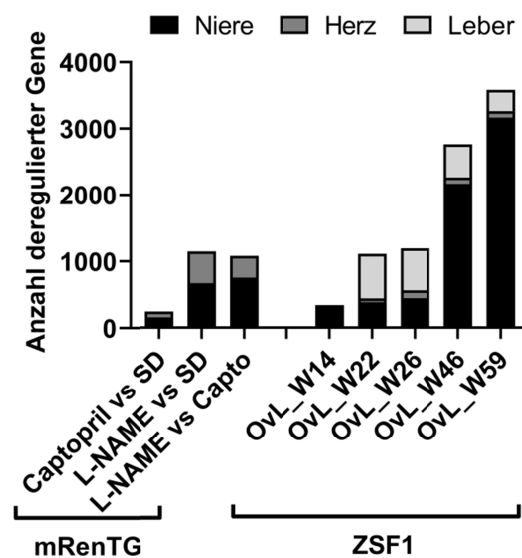
Kreatiningehalt im Urin normalisiert. e) Quantifizierung der Proteinbiomarker KIM-1, OPN, CYSC und CLU im Urin von 14, 22 und 26 Wochen alten fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten mittels Mesoscale (Schlank W14: n=3, weitere Endpunkte: n=4). Die Proteinbiomarker wurden auf den Kreatiningehalt im Urin normalisiert. Es sind die relativen arithmetischen Mittelwerte einschließlich Standardabweichung in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur gleichaltrigen schlanken Kontrolle dargestellt. f) Quantifizierung der mRNA von KIM-1, OPN, CYSC und CLU mRNA im Nierenhomogenat mittels Mikroarray (wk14: n=5, wk26: n=10). Es sind die relativen arithmetischen Mittelwerte einschließlich Standardabweichung in fettleibigen ZSF1 verglichen mit gleichalten schlanken ZSF1-Kontrolltieren gezeigt. Statistische Signifikanz wurde mittels zweifachen ANOVA einschließlich Šídák's Test für multiple Vergleiche getestet. Statistische Signifikanz ist als \* $p \leq 0,05$  oder \*\* $p \leq 0,0005$  relativ zur entsprechenden Kontrolle dargestellt. UCrea: Kreatinin im Urin. KIM-1: Kidney Injury Molecule-1. OPN: Osteopontin. CYSC: Cystatin C. CLU: Clusterin. W: Woche. OvL: Fettleibig verglichen zu schlanker Kontrolle (engl: *Obese vs lean*).

In 14 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Tiere war der Gesamtproteingehalt im Urin relativ zur Kreatininkonzentration signifikant um das Siebenfache verglichen zur schlanken Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 7d). Der Gesamtproteingehalt stieg in 22 und 26 Wochen alten fettleibigen Tieren weiter auf das etwa 17-fache verglichen zur Kontrollgruppe an, während der Gehalt im Urin schlanker Kontrolltiere über die Zeit gering und unverändert blieb. Zusätzlich zur Gesamtproteinquantifizierung wurden im Urin von 14 und 26 Wochen alten ZSF1-Ratten die vier Proteinbiomarker für Nierenschäden KIM-1, OPN, CYSC und CLU analysiert (Kapitel 1.3 der Einleitung). Zu beiden Zeitpunkten war die Menge aller vier gemessenen Biomarker signifikant im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten relativ zur Kontrolle erhöht (Abbildung 7e), wobei lediglich KIM-1 in fettleibigen ZSF1-Tieren von Woche 14 bis 26 leicht um das etwa Zweifache anstieg. OPN, CYSC und CLU hingegen zeigten keine signifikanten Veränderungen mit zunehmendem Alter der Tiere. Auf Genexpressionsebene waren alle vier Proteinbiomarker in fettleibigen ZSF1-Ratten signifikant verglichen zur Kontrolle erhöht, wobei der stärkste Effekt ebenfalls für KIM-1 gezeigt werden konnte (Abbildung 7f). Zusammenfassend zeigten die erhöhte Urinproduktion, die erhöhte Proteinmenge im Urin, auch Proteinurie genannt, das reduzierte Kreatinin im Urin sowie die neueren Proteinbiomarker eine deutliche Einschränkung der Nierenfunktion sowie Polyurie in 14 bis 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten. Proteinurie und KIM-1 waren dabei die einzigen Parameter, welche auf ein Fortschreiten des Nierenschadens mit zunehmendem Alter der fettleibigen ZSF1-Ratten hindeuten.

## 4.2 Genexpressionsanalysen von Niere, Herz und Leber im ZSF1- und mRenTG-Rattenmodell

In Kapitel 4.1 der Ergebnisse wurden ausgeprägte adverse Veränderung der Niere und Leber im ZSF1-Rattenmodell für das MetS und der Niere und des Herzens im

mRenTG-Rattenmodell für essentiellen Bluthochdruck gezeigt. Im Folgenden soll nun untersucht werden, welche Genexpressionsänderungen mit diesen histopathologischen Beobachtungen einhergehen und mögliche Pathomechanismen identifiziert werden. Für die Niere werden die zwei hier verwendeten Tiermodelle dabei untereinander und mit je einem Tiermodell für Glomerulonephritis und AA-induzierter Nephropathie verglichen, um generelle pathophysiologische Mechanismen in der Niere von potenziell Krankheitsmodell- oder CKD Stadium-spezifischen Veränderungen zu unterscheiden. Es erfolgte ebenfalls ein Vergleich der renalen Genexpression in ZSF1-Ratten mit Daten aus Patienten mit DN, um die Humanrelevanz des ZSF1-Rattenmodells zu untersuchen.



**ABBILDUNG 8: ANZAHL SIGNIFIKANT VERÄNDERTER GENE IN NIERE, HERZ UND LEBER IN MREN TG- UND ZSF1-RATTEN**

Signifikant veränderte Expression von Genen in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME oder Captopril und in SD-Ratten (n=5) sowie in fettleibigen und schlanken 14, 22, 26, 46 und 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (W14+22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). mRNA-Profile wurden mit Hilfe von Affymetrix Mikroarrays (Chips: Clariom™ D Ratte) erstellt. Es ist die Anzahl signifikant veränderter Gene in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen mit gleichaltrigen schlanken ZSF1-Kontrolltieren oder in mRenTG-Ratten nach L-NAME- oder Captopril-Behandlung verglichen mit SD-Ratten oder mRenTG-Ratten nach Captopril-Behandlungen gezeigt. Eine detaillierte Darstellung der Signifikanztestung ist in den Abbildungen 9, 10 und 14 dargestellt. mRenTG: Maus Renin-transgen. SD: Sprague-Dawley-Ratte. L-NAME: N(ω)-nitro-L-Argininmethylester. W: Woche. OvL: Fettleibig verglichen zu schlanker Kontrolle. Capto: Captopril.

Im mRenTG-Ratten war die renale Genexpression nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME verglichen zur SD-Kontrolle und verglichen zu Captopril-behandelten mRenTG-Ratten mit 681 und 764 veränderten Genen eindeutig beeinflusst (Abbildung 8, Anhang-Tabelle 27). In SD-Ratten konnte nach Behandlung mit L-NAME keine relevante Änderung der renalen Genexpression relativ zu unbehandelten SD-Ratten



festgestellt werden (Anhang-Tabelle 27). Im Gegensatz zum ZSF1-Modell war die Genexpression im Herzen in mRenTG-Ratten nach L-NAME Behandlung deutlicher verändert (Abbildung 8). Captopril-behandelte mRenTG-Ratten zeigten nur geringfügige Veränderungen der Genexpression in Niere und Herz verglichen zu SD-Ratten.

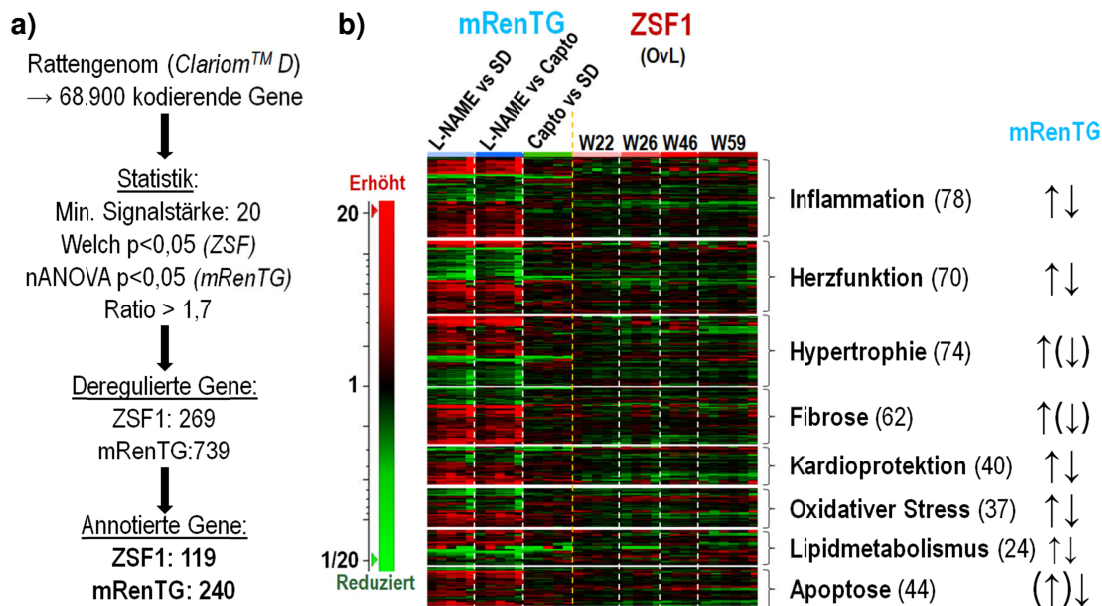
Im ZSF1-Modell wurde die Genexpression in Niere, Herz und Leber bestimmt. In den fettleibigen ZSF1-Ratten wurden im Alter von 14 Wochen signifikante aber moderate Änderungen in der renalen Expression von insgesamt 338 Genen verglichen zur Kontrolle identifiziert (Abbildung 8, Anhang-Tabelle 27). Diese stieg bis Woche 26 schwach, bis Woche 59 deutlich auf 3173 Gene an. In der Leber waren die Veränderungen der Genexpression in Woche 22 mit 683 betroffenen Genen am stärksten aber dennoch moderat und nahmen mit zunehmendem Alter ab. Der Effekt des MetS auf die kardiale Genexpression war zu allen analysierten Zeitpunkten gering.

#### 4.2.1 Herz

Ausgeprägter Bluthochdruck wurde sowohl in Tiermodellen als auch Patienten mit einer Schädigung des Herzens assoziiert. Im Kapitel 4.1.2 wurde bereits eine perivaskuläre sowie myokardiale Fibrose in L-NAME behandelten mRenTG-Ratten beschrieben. Im Folgenden wurde untersucht, wie diese beiden Krankheitsbilder die kardiale Genexpression in hypertensiven mRenTG-Ratten beeinflussen und ob vergleichbare Veränderungen im ZSF1-Rattenmodell für MetS identifiziert werden können.

Auf Genexpressionsebene waren 739 Gene im mRenTG- und 269 Gene im ZSF1-Tiermodell signifikant gegenüber den entsprechenden Kontrollen dereguliert. Lediglich 92 Gene waren in beiden Tiermodelle signifikant verändert. 363 der insgesamt 916 Gene wurden manuell durch Literaturrecherche annotiert (Abbildung 9a). In mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME konnten dabei Veränderungen der Genexpression beobachtet werden, welche mit Entzündung, der Herzfunktion, Hypertrophie, Fibrose, Schutzmechanismen des Herzens, oxidativen Stress, Veränderungen des Lipidmetabolismus, mitochondriale Dysfunktion und Apoptose assoziiert waren (Abbildung 9b, Tabelle 14). Vergleichbare Veränderungen waren sowohl nach Normalisierung auf die SD-Kontrolle als auch auf die Captopril-behandelten mRenTG-Kontrolltiere zu beobachten, bei denen Captopril als ACE-Inhibitor den Effekten der Renin-Überexpression entgegenwirkt. Entsprechend konnten

zwischen Captopril-behandelten mRenTG-Ratten und SD-Ratten keine signifikanten Effekte auf die Genexpression identifiziert werden.



#### ABBILDUNG 9: GENEXPRESSION IM HERZEN VON MRENTG- UND ZSF1-RATTEN

Genexpressionsanalyse in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME oder Captopril und SD-Ratten ( $n=5$ ) sowie in fettleibigen und schlanken, 22, 26, 46 und 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (W22:  $n=5$ ; W26:  $n=10$ ; W46:  $n=4$ ; W59:  $n=6$ ). a) Statistische Schwellenwerte und Anzahl signifikanter und funktionell annotierter Gene. b) Genexpressionsanalyse in mRenTG- und ZSF1-Ratten. Profile wurden mit Affymetrix Mikroarrays gemessen. Es ist die relative Genexpression in fettleibigen ZSF1 verglichen mit dem arithmetischen Mittelwerte gleichalten schlanken ZSF1-Kontrolltieren oder die relative Genexpression in mRenTG-Ratten nach L-NAME- oder Captopril-Behandlung verglichen mit dem arithmetischen Mittelwerte in SD-Ratten oder mRenTG-Ratten nach Captopril-Behandlungen gezeigt. Die deregulierten Gene wurden nach funktioneller Annotation in Gruppen aufgeteilt. Die Genexpressionsprofile dieser Gengruppen sind als Heatmap dargestellt, nach hierarchischem Clustering mit euklidischer Metrik als Distanzmaß. mRenTG: Maus Renin-transgen. SD: Sprague-Dawley-Ratte. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester. W: Woche. Capto: Captopril. Min.: Minimale. OvL: Fettleibig relativ zu schlank.

In Herzen von ZSF1-Tieren konnten keine vergleichbaren Effekte auf die Genexpression beobachtet werden (Abbildung 9b). Hier war nur eine tendenziell erhöhte Expression von Klf15-Zielgenen und von Genen assoziiert mit der kardiale Fettsäureoxidation in fettleibigen ZSF1-Tieren verglichen zu ZSF1-Kontrolle bis Woche 26 festzustellen (Anhang-Abbildung 29), die Gene erfüllten allerdings nicht die angewandten Kriterien der statistischen Signifikanz. In 46 und 59 Wochen alten Tieren konnten keine Veränderungen der Genexpression mit Assoziation zur Fettsäureoxidation festgestellt werden. Die Genexpression von Komponenten der mitochondrialen Atmungskette war in fettleibigen ZSF1 Tieren im Alter von 14 bis 59 Wochen tendenziell reduziert, allerdings war auch dieser Effekt statistisch nicht signifikant.

**TABELLE 14: AUSWAHL ANNOTIERTE GENE UND DEREN ASSOZIATION MIT KARDIALEN PATHOMECHANISMEN IM HERZEN DES mREN-TG-RATTENMODELL**

Auswahl manuell annotierter Gene (Pubmed, Google scholar) mit veränderten kardialen Genexpressionsprofilen in mRenTG-Ratten nach L-NAME Behandlung verglichen zur SD-Kontrolle oder zu mRenTG-Ratten nach Captopril-Behandlung. Die aufgelisteten Pathomechanismen wurden von den assoziierten Genen unter Berücksichtigung der Richtung ihrer veränderten Expression abgeleitet. UPR: engl. *unfolded protein response*; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies. mRenTG: Maus Renin-transgen. SD: Sprague-Dawley-Ratte.

Pathomechanismen	Auswahl assoziierter Gene
<b>Inflammation</b> (Erhöhte Anzahl von Gene mit Spezifität für Immunzellen, Aktivierung des Complement-Systems)	C1s, C4b, Fcgr2a, Ly6c, Cd300lg, Sema5a, Ccl2, Ccl7
<b>Kardioprotektion</b>	Nppa, Nppb, Hspb7, Hspb8, Hsp90b1
<b>Hypertrophie</b>	Kcnd3, Kcnd2, Nr1d2, Aplnr, Apln, Dusp12, Mef2a, Ace2, Npr3
<b>Oxidativer Stress</b> (Erhöhte ROS Produktion, ROS Detoxifizierung, Erhöhte UPR)	Gstz1, Gstm7, Mpst, Hspb1, Hspb9, Maa, Ncf1, Txnip
<b>Kontraktionsfähigkeit des Herzens</b> (Veränderung des Aktionspotentials von Herzmuskelzellen)	Scn4b, Scn7a, Cacng4, Kcna2, Kcnd2, Kcnh2, Kcnj2, Hcn4, Scn3b
<b>Fibrose</b> (Erhöhte EZM-Produktion)	Adams1, Col8a1, Eln, Leprel1, Epdr1, P4ha1, Tgfb2, Itga5, Itgb1
<b>Apoptose</b>	Casp7, Perp, Pmp1k, Maa

Zusätzlich zur manuellen Annotation wurden Regulatoren der Genexpression, aktivierte oder inhibierte kanonischer Signalwege und biologisch und toxikologisch relevanter Prozesse im Datensatz beider Tiermodelle mit Hilfe der IPA-Software identifiziert. In L-NAME behandelten mRenTG-Ratten wurden unter anderem eine erhöhte Proliferation sowie eine erhöhte Aktivität von Tgf- $\beta$ 1, Angiotensinogen (Agt), Myotrophin (Mtpn) und Endothelin-1 (Edn1) vorhergesagt (Tabelle 15). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der manuellen Annotation wurde im Herzen des ZSF1-Rattenmodell nach Anwendung der statistischen Schwellenwerte keine veränderten kanonischen Signalwege oder biologisch und toxikologisch relevante Prozesse identifiziert (Tabelle 15). Lediglich eine reduzierte Aktivität des Genexpressionsregulators GATA4 wurde in 59 Wochen alten ZSF1-Tieren verglichen zur schlanken Kontrolle durch die Software berechnet.

**TABELLE 15: IPA-ANALYSE DER KARDIALEN GENEXPRESSION IN mREN-TG- UND ZSF1-RATTEN**  
IPA-basierte Identifikation von Regulatoren, kanonischen Signalwegen und Tox- und Bio-Funktionen im veränderten kardialen Genexpressionsprofil von mRenTG-Ratten nach achtwöchiger L-NAME Behandlung verglichen zur SD-Kontrolle oder mRenTG-Ratten nach Captopril-Behandlung (n=5), und in schlanken und fettleibigen ZSF1-Ratten (W22: n=5; W26:

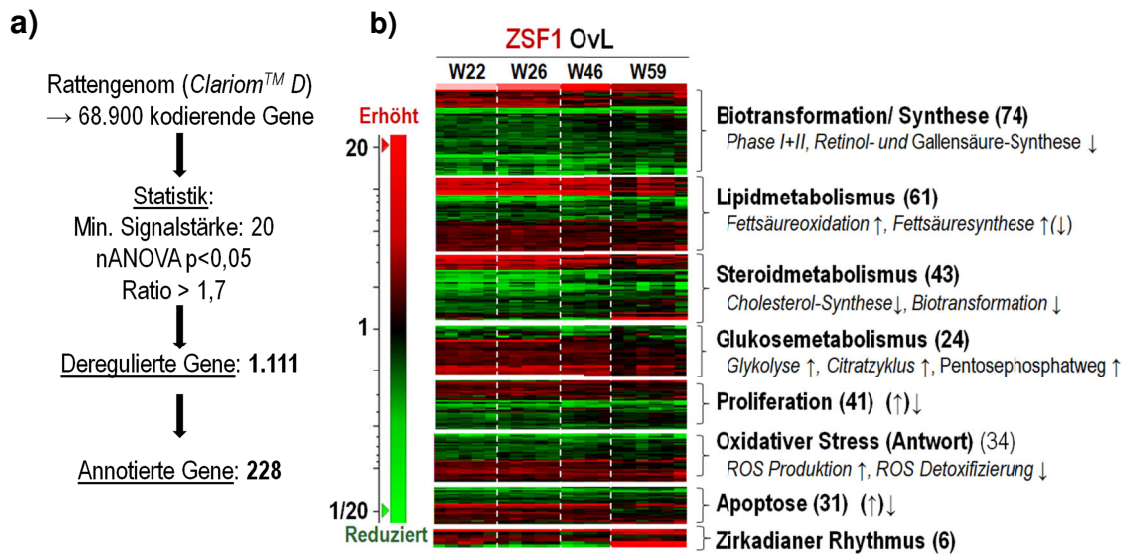
n=10; W46: n=4; W59: n=6). Für die IPA-Software wurden Vorhersagen mit Aktivierungswerten (z-Scores) von  $z \leq -2$  /  $\geq 2$  mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,005$  verwendet ( $\uparrow$ : z-score positiv, Aktivierung vorhergesagt.  $\downarrow$ : z-score negativ, Inhibierung vorhergesagt). mRenTG: Maus Renintransgen. SD: Sprague-Dawley-Ratte.

	<b>mRenTG + L-NAME</b> (vs. mRenTG + Captopril oder SD)	<b>Fettleibige ZSF1-Ratten</b> (vs. schlank)
<b>Regulatoren</b> (Auswahl)	Agt ( $\uparrow$ ), Tgfb1 ( $\uparrow$ ), Mtpn ( $\uparrow$ ), Edn1( $\uparrow$ ), Sptlc2 ( $\downarrow$ )	W59: GATA4 ( $\downarrow$ )
<b>Kanonische Signalwege</b>	Apelin Herz-Fibroblasten Signalweg ( $\downarrow$ ), Integrin Signalweg ( $\uparrow$ )	/
<b>Tox- und Bio-Funktionen</b>	Zellproliferation im Herz ( $\uparrow$ )	/

Zusammengefasst deutet die Genexpression in mRenTG-Tiere auf eine Schädigung des Herzens einschließlich Fibrose, und adaptive Reaktionen wie Hypertrophie und Proliferation der Kardiomyozyten hin. In fettleibige ZSF1-Ratten konnten keine Herz-spezifische Pathomechanismen identifiziert werden, welche mit einer potenziellen Schädigung des Herzens in Verbindung stehen könnten.

#### 4.2.2 Leber

Die metabolischen Veränderungen im Rahmen des MetS wurden in Menschen mit pathologischen Veränderungen der Leber einschließlich Funktionseinschränkungen und Hepatosteatose assoziiert. Auf histopathologischer Ebene wurde in Kapitel 4.1.1 bereits eine ausgeprägte zentrilobuläre Vakuolisierung der Hepatozyten in 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten festgestellt, welche charakteristisch für das klinische Bild der Hepatosteatose ist. Im Folgenden wurde nun die hepatische Genexpression in 22 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten analysiert. Die größte Veränderung der Genexpression mit 683 deregulierten Genen wurde in der Leber fettleibiger, 22 Wochen alter ZSF1-Ratten festgestellt. Die Anzahl der Gene mit verändertem Genexpressionsprofil relativ zu schlanken Kontrollen nahm danach bis zum Alter von 59 Wochen ab (Abbildung 8, Anhang-Tabelle 27). Insgesamt waren über alle Zeitpunkte 1111 Gene im ZSF1-Rattenmodell signifikant verändert (Abbildung 10a). Von diesen wurden 228 Gene einer manuellen Annotation unterzogen.



**ABBILDUNG 10: GENEXPRESSION IN DER LEBER VON ZSF1-RATTEN**

Genexpressionsanalyse in fettleibigen und schlanken, 22, 26, 46 und 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (W22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). a) Statistische Schwellenwerte und Anzahl signifikanter und funktionell annotierter Gene. b) Genexpressionsprofile in ZSF1-Ratten. Profile wurden mit Affymetrix Mikroarrays gemessen. Es ist die relative Genexpression in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen mit dem arithmetischen Mittelwerte gleichaltrigen schlanken ZSF1-Kontrolltieren gezeigt. Die deregulierten Gene wurden nach funktioneller Annotation in Gruppen aufgeteilt. Die Genexpressionsprofile dieser Gengruppen sind als Heatmap dargestellt, nach hierarchischem Clustering mit euklidischer Metrik als Distanzmaß. W: Woche. Min.: Minimale. ROS: Reaktive Sauerstoffspezies. OvL: Fettleibig relativ zu schlank.

Die Genexpressionsveränderungen in fettleibigen, 22 bis 46 Wochen alten ZSF1-Ratten relative zu gleichaltrigen schlanken Kontrollen waren hauptsächlich mit Phase I und II der Biotransformation, Veränderungen des Kohlenhydrat-, Lipid- und Steroidstoffwechsels und oxidativem Stress assoziiert (Abbildung 10b, Tabelle 16). Die Genexpression von Enzymen der Phase I und Phase II Biotransformation war dabei überwiegend reduziert. Gene, die eine Rolle im Glukosemetabolismus spielen, einschließlich Glykolyse, Citratzyklus und dem Pentosephosphatweg, waren hingegen induziert. Ein vergleichbarer Effekt wurde für den Lipidmetabolismus einschließlich Fettsäureoxidation und Fettsäuresynthese festgestellt. Gene, die mit dem Steroidmetabolismus assoziiert sind, wie zum Beispiel der Cholesterinbiosynthese, waren überwiegend reduziert. Gene, die mit der Produktion von oxidativem Stress assoziiert sind, zeigten eine höhere Expression. Die Expression von Genen, welche in der Entgiftung von ROS involviert sind, waren hingegen reduziert. In 59 Wochen alten Tieren waren vergleichbare Effekte zwar noch erkennbar, erreichten allerdings überwiegend keine statistische Signifikanz mehr (Abbildung 10b).

**TABELLE 16: AUSWAHL ANNOTIERTE GENE UND DEREN ASSOZIATION MIT HEPATISCHEN PATHOMECHANISMEN IN DER LEBER DES ZSF1-RATTENMODELL**

Auswahl manuell annotierter Gene (Pubmed, Google scholar) mit veränderten hepatischen Genexpressionsprofilen in fettleibigen und schlanken, 22 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten (W22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die aufgelisteten Pathomechanismen wurden von den assoziierten Genen unter Berücksichtigung der Richtung ihrer veränderten Expression abgeleitet.

Auswahl assoziierter Gene	
<b>Biotransformation</b>	<u>Phase I</u> : Cyp2c24, Cyp3a2, Cyp7b1, Cyp3a9, Cyp4a8, Cyp2e1, Cyp1a2, <u>Phase II</u> : Aldh1a1, Aldh1a7, Sult4a1, Sult2a2, Sult1c3, Sult1c2, Gstp1, Gstm5, Mgst3, Gstm3, Ugt2b1
<b>Fettsäuremetabolismus</b>	<u>Synthese</u> : Elovl6, Elovl2 <u>Oxidation</u> : Acs15, Eci1, Hadhb, Slc27a5, Aldh1a1, Aldh1a7, Aldh112
<b>Oxidative Stressantwort und Glutathion-Metabolismus</b>	Fmo1, Gsta3, Gstk1, Ggstm1, Gstm3, Irs2, Mgst3, Ppib, Prdx1, Rras, Txn, Pemt, Gss, Akt1
<b>Inflammation</b>	Abcb4, Bcl6, Cbs/Cbsl, Ccn1, Egr1, Igfbp1, Il1r1, Lect2, Pnpla3, Tgfb1, Ccl5, Tnfsf13, Irs2, Nox4, Rras, Akt1
<b>Steroid-Metabolismus</b>	Abcg5, Abcg8, Insig2, Pltp, Pon3, Scap, Sreb1, ApoA4, Epm2a, Fgf21, Gpam, Nr113, Rgn, Scd, Vnn1

Wie das Herz wurden der Datensatz der Leber einer IPA-basierten Identifikation von übergeordneten Regulatoren, beeinflussten Signalwegen und Funktionen der deregulierten Gene in biologischen und toxikologischen Prozessen unterzogen. Durch die IPA-Analyse wurde dabei unter anderem die Aktivierung übergeordneter Regulatoren wie Peroxisomen Proliferator Aktivierter Rezeptoren (Ppar), Ghrelin (Ghrl) und Sreb1 Transkriptionsfaktoren, sowie eine reduzierte Aktivität der insulininduzierten Gene 1 (Insig1) und 2 (Insig2) und dem Insulinrezeptor (Insr) vorhergesagt (Tabelle 17).

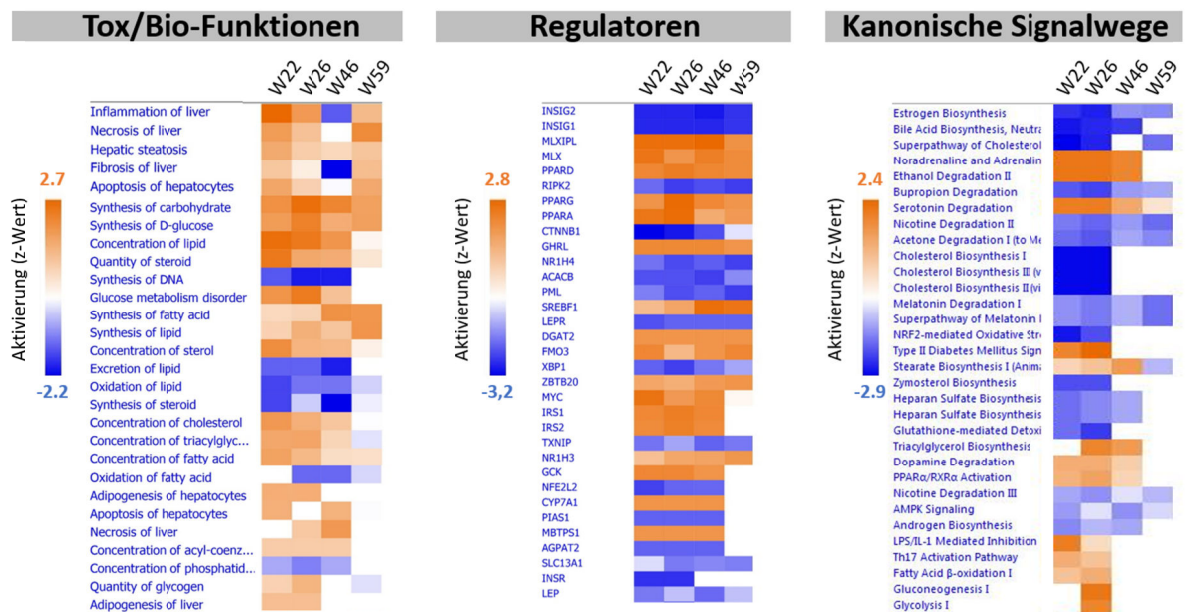
**TABELLE 17: IPA-ANALYSE DER HEPATISCHEN GENEXPRESSION IN ZSF1-RATTEN**

IPA-basierte Identifikation von Regulatoren, kanonischen Signalwegen und Tox- und Bio-Funktionen im veränderten hepatischen Genexpressionsprofil von fettleibigen und schlanken, 22 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten (W22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Für die IPA-Software wurden Vorhersagen mit Aktivierungswerten (z-Scores) von  $z \leq -2$  /  $z \geq 2$  mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,005$  verwendet (↑: z-score positiv, Aktivierung vorhergesagt. ↓: z-score negativ, Inhibierung vorhergesagt).

Fettleibige ZSF1-Ratten (vs. Kontrolle)	
<b>Regulatoren</b>	Insig1+2 (↓), Mlx(ipl) (↑), Ppar-A/D/G (↑), Ctnnb1 (↓), Nr1h4 ↓, Sreb1 ↑, Lepr ↓, Irs1+2 ↑, Insr ↓, Acacb ↓, Pten ↓, Ehhadh ↓, Ghrl ↑, Xbp1 ↓, Dgat2 ↑,
<b>Kanonische Signalwege</b>	Cholesterin Biosynthese ↓, Gallensäure Biosynthese ↓, NRF2-vermittelte Oxidative Stressantwort ↓, Typ-2-Diabetes mellitus Signalwege ↑, Glutathion-vermittelte Entgiftung ↑, Glykolyse ↑, Glukoneogenese ↑, Triacylglycerolbiosynthese ↑

<b>Tox- und Bio-Funktionen</b>	Entzündung der Leber ↑, Synthese von D-Glukose ↑, Konzentration von Lipiden/ Steroiden/Sterol ↑, DNA-Synthese ↓, Fettsäuremetabolismus ↑, Cholesterolsynthese ↓, Insulinresistenz ↑,
--------------------------------	--

Mit Ausnahme von Ctnnb1, Xbp1, Ehhadh und Insr, welche mit zunehmendem Alter der ZSF1-Tiere als zunehmend inhibiert vorhergesagt wurden, waren die Beobachtungen unabhängig vom Alter der Tiere in allen Gruppen für die meisten identifizierten Endpunkte vergleichbar (Abbildung 11).



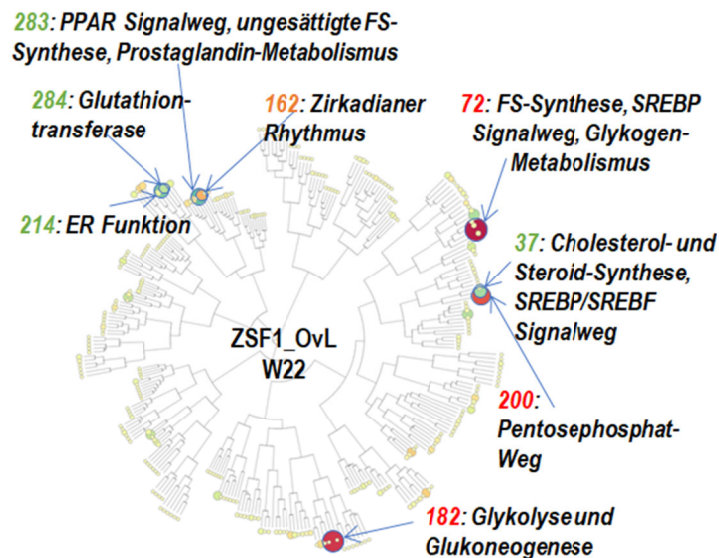
**ABBILDUNG 11: IPA-ANALYSE DER HEPATISCHEN GENEXPRESSION IN ZSF1-RATTEN**

IPA-basierte Identifikation von Regulatoren, kanonischen Signalwegen und Tox- und Bio-Funktionen im veränderten hepatischen Genexpressionsprofil von fettleibigen und schlanken, 22 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten (W22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Für die IPA-Software wurden Vorhersagen mit Aktivierungswerten (z-Scores) von  $z \leq -2/ \geq 2$  mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,005$  verwendet (Orange: z-score positiv, Aktivierung vorhergesagt. Blau: z-score negativ, Inhibierung vorhergesagt). W: Woche.

Die Genexpressionsänderungen wurden zusätzlich einer WGCNA mittels der TXG-MAPr Webapplikation unterzogen, bei der Gene entsprechend ihrer Ko-Expression in sogenannte Module oder Netzwerke zusammengefasst werden. Dabei werden häufig Gene mit ähnlichen Funktionen den gleichen Modulen zugeordnet. Die Ergebnisse dieser Form der Ko-Expressionsanalyse werden in Form von zirkulären Dendrogrammen dargestellt (Abbildung 12). Gemeinsam induzierte oder reprimierte Gengruppen, auch Module genannt, werden dabei in der Regel benachbarten Ästen des Dendrogrammes zugeordnet. Die Modulgröße repräsentiert die Größe des mit dem Modul assoziierten EGS, die Modulfarbe das Vorzeichen (positiv oder negativ) des EGS. Orange bis Rot bedeutet hierbei einen positiven EGS, welcher auf eine



überwiegende Induktion der Gene des Modules rückschließen lässt. Grün bis blau visualisiert einen negativen EGS und überwiegend reduzierte Genexpression der assoziierten Gene (Langfelder und Horvath 2007). Die Vorhersage der biologischen Funktion erfolgte durch *Gene Ontology*-Überrepräsentationsanalyse der einzelnen Gene der Module.



**ABBILDUNG 12: ERGEBNISSE DER WGCNA-ANALYSE DER HEPATISCHEN GENEXPRESSION IN ZSF1-RATTEN**

Relevante Module, die mit der WGCNA für 22 Wochen alte ZSF1-Ratten (n=5) identifiziert wurden. Module mit einem großen, positiven EGS sind in rot dargestellt, Module mit einem kleinen, negativen EGS in grün. Die funktionelle Annotation erfolgte durch eine *Gene Ontology*-Überrepräsentationsanalyse. Die WGCNA wurde in der TXG-MAPr Webapplikation durchgeführt. Für die Analyse wurden signifikant deregulierte Gene verglichen zu gleichaltrigen Kontrolltieren verwendet (Welch/nAnova  $p \leq 0,05$ ; Effektgröße  $> 1,7$ ; minimale Signalstärke 20). FS: Fettsäure. ER: Endoplasmatisches Retikulum. SREBP: engl. *Sterol regulatory element-binding protein*. SREBF: engl. *Sterol regulatory element-binding transcription factor*. WGCNA: engl. *Weighted gene co-expression network analysis*.

In Übereinstimmung mit der IPA-basierten Analyse wurden in der WGCNA der ZSF1-Tieren überrepräsentierte Module identifiziert, welche auf eine überwiegende Induktion der Fettsäuresynthese, des Glykogen- und Glukosemetabolismus einschließlich Glykolyse und Glukoneogenese und des Pentosephosphatweges in der Leber hindeuten. Zudem wurde eine Reduktion der Familie der Glutathion-S-Transferasen (GSTs) und somit ROS-Entgiftung, und eine Veränderung des zirkadianen Rhythmus und des Srebp- und Srebf-Signalweg identifiziert (Abbildung 12, Anhang-Abbildung 30). Das Modul 72, das Gene der Fettsäuresynthese, des Glykogenmetabolismus und dem Srebp-Signalweg enthält, wird zudem mit dem *Adverse outcome pathway* „Hepatosteatose“ assoziiert. Der Vergleich von ZSF1-Tieren verschiedenen Alters bestätigte dabei, dass die meisten Veränderungen der hepatischen Genexpression



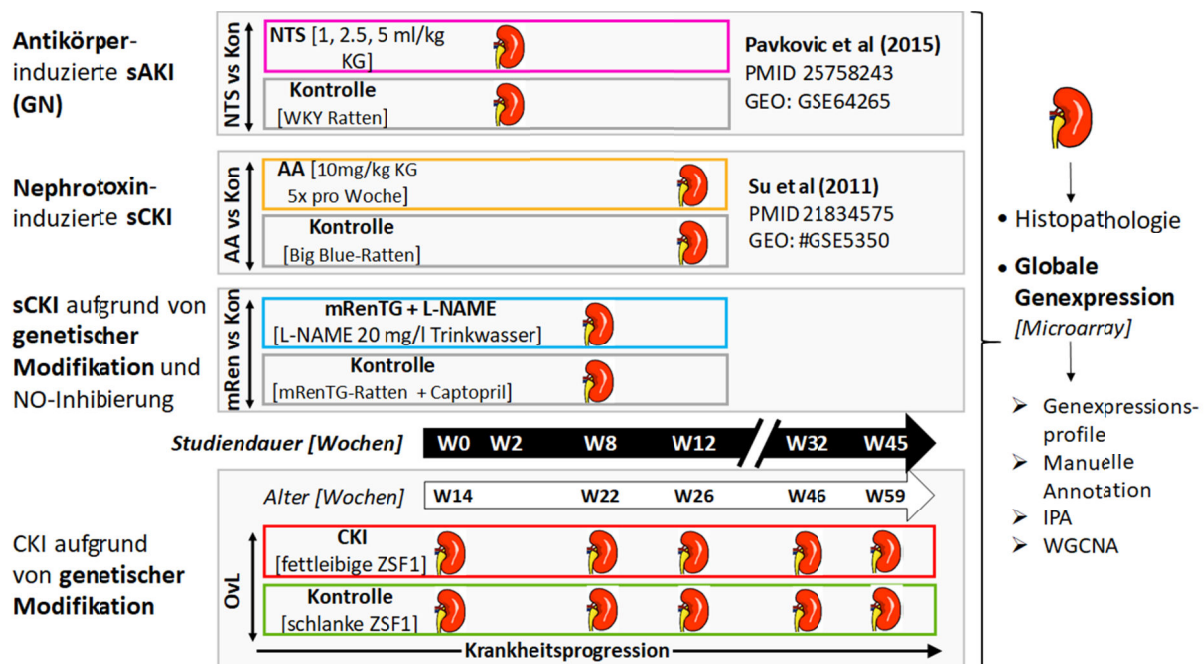
schon in 22 Wochen alten Tieren beobachtet werden konnten und diese mit zunehmendem Alter abnahmen (Abbildung 12, Anhang-Abbildung 30). In 59 Wochen alten Tieren waren lediglich Gene assoziiert mit dem zirkadianen Rhythmus signifikant im Datensatz überrepräsentiert (Anhang-Abbildung 30).

Zusammenfassend lassen sowohl die literaturbasierte Annotation der deregulierten Gene als auch die WGCNA und IPA-basierte Analyse auf eine deutliche Veränderung der Leberfunktion in fettleibigen ZSF1-Ratten schließen, welche sowohl Veränderungen des Glukose- und Lipid- und Steroidmetabolismus als auch der Biotransformation sowie des Insulinsignalwegs umfassen.

### 4.2.3 Niere

CKD sind zentrale Bestandteile des fortgeschrittenen Krankheitsbildes von MetS- und Bluthochdruck-Patienten. Die histopathologische und Genexpressionsanalyse zeigten bereits ausgeprägte renale Schäden und Veränderungen im ZSF1-Modell und im mRenTG-Rattenmodell auf histopathologischer Ebene (Kapitel 4.1). Im Folgenden sollen die Nierenschäden in beiden Tiermodellen auf Genexpressionsebene untersucht werden. Die Genexpressionsänderungen wurden des Weiteren mit der renalen Genexpression in Patienten mit DN und zwei Tiermodellen mit Toxin-induzierten Nierenschäden verglichen, um tiermodellsspezifische von allgemeinen Pathomechanismen zu unterscheiden. Hierzu wurden zwei publizierte Datensätze verwendet: Renale Genexpression nach (1) einer sub-chronischen Nierenschädigung nach 12-wöchiger AA-Behandlung (Su et al. 2011) und (2) einer sub-akuten Nierenschädigung, die mit Antikörpern gegen die GBM durch NTS induziert worden war (Pavkovic et al. 2015a). In der Studie von Pavkovic et al (2015) wurden acht Wochen alte Wistar Kyoto (WKY)-Ratten einmalig intravenös mit 1, 2,5 und 5 ml/kg NTS zur Induktion einer Glomerulonephritis behandelt. Nach zwei Wochen wurde RNA aus der Niere isoliert und die Genexpression bestimmt. Der resultierende Rohdatensatz ist unter GSE64265 in der GEO-Datenbank verfügbar. In der Studie von Su et al (2011) wurden Big Blue-Ratten im Alter von sechs Wochen per Gavage mit 10 mg/kg Körpergewicht AA behandelt. Die Behandlung erfolgte fünfmal die Woche über einen Zeitraum von 12 Wochen. Anschließend wurde die renale Genexpression gemessen. Die Rohdaten sind unter GSE5350 in der GEO-Datenbank verfügbar. Die statistische Auswertung erfolgte analog zur ZSF1- sowie mRenTG-Studie (Abbildung 14a). Details zur experimentellen Durchführung der veröffentlichten Studien finden sich

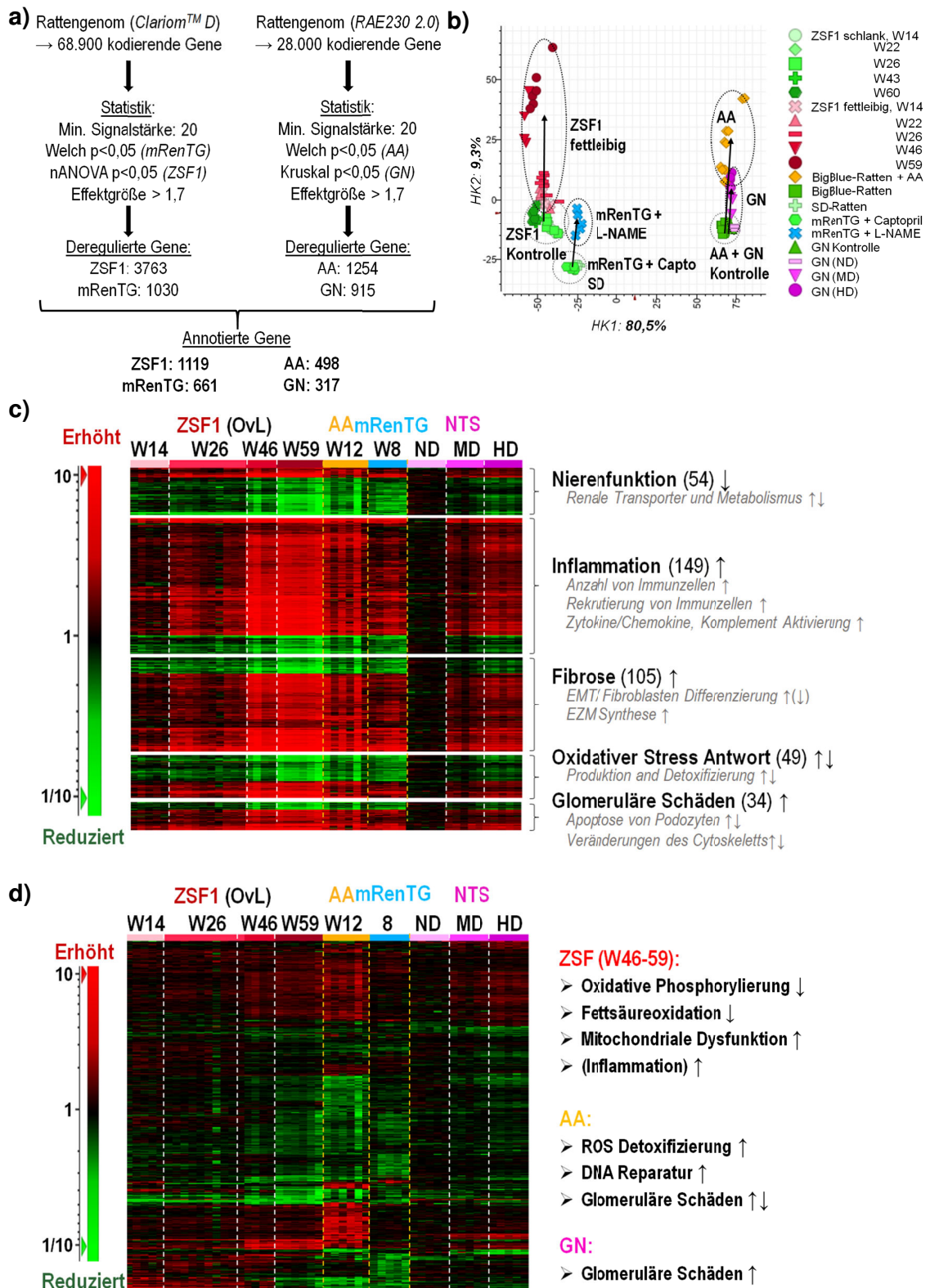
in den entsprechenden Publikationen. Ein Überblick über alle Studien ist in Abbildung 13 dargestellt.



**ABBILDUNG 13: ÜBERSICHT ÜBER ALLE VERWENDETEN STUDIEN FÜR DIE ANALYSE DER RENALEN GENEXPRESSION**

GN: Glomerulonephritis. sAKI: engl. *Sub-acute kidney injury*. (s)CKI: engl. *(Sub-)Chronic kidney injury*. NTS: Nephrotoxisches Serum. WKY: Wistar-Kyoto. KG: Körpergewicht. Kon: Kontrolle. WGCNA: engl. *Weighted gene co-expression network analysis*. IPA: engl. *Ingenuity-pathway analysis*. AA: Aristolochiasäure. NO: Stickstoffmonoxid. L-NAME: N(ω)-nitro-L-Argininmethylester. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. W: Wochen. OvL: Fettleibig relativ zu schlank.

In 14 bis 59 alten, fettleibigen ZSF1-Ratten war die Expression von 3763 Genen verglichen zur schlanken Kontrolle signifikant verändert (Abbildung 14a). Die Veränderungen der renalen Genexpression in mRenTG-Ratten sowie AA- und NTS-behandelten Ratten war im Vergleich zum ZSF1-Modell mit insgesamt 1030, 1254 und 317 signifikant deregulierten Genen schwächer ausgeprägt. Die Genexpressionsprofile in den verschiedenen Tiermodellen wurden in einer HKA verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass 89,8% der Variabilität in den zugrundeliegenden Datensätzen durch zwei Hauptkomponenten beschrieben werden konnten (Abbildung 14b). Der erste Hauptkomponente (HK1), welcher 80,5% der Variabilität im Datensatz beschreibt, trennte dabei die ZSF1-Ratten nur moderat von den mRenTG-Ratten, jedoch deutlich von AA- und NTS-behandelte Ratten.



**ABBILDUNG 14: GENEXPRESSION IN DER NIERE VON mRENTG- UND ZSF1-RATTEN UND VERGLEICH ZU RATTENMODELLEN FÜR GLOMERULONEPHRITIS UND AA-NEPHROPATHIE**  
 Genexpressionsanalyse in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME oder Captopril und SD-Ratten (n=5) sowie in fettleibigen und schlanken 14, 22, 26, 46 und 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (W14/22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die Ergebnisse wurden mit publizierten Datensätzen von AA-behandelten Ratten (n=6) und NTS-induzierter GN (NTS: n=5; Kontrollen n=3) verglichen. a) Statistische Schwellenwerte und Anzahl deregulierter und annotierter Gene. Für die Annotationen der Genexpressionsprofile in den hier analysierten

Tiermodellen wurden Schwellenwerte von  $p \leq 0,001$  (Welch-Test) und  $BH-q \leq 0,005$  (Anova) gewählt. b) HKA basierend auf Genen, welche in mindestens einem Tiermodell signifikant dereguliert waren. Vergleichbare Genexpressionsprofile (c) und unterschiedliche Genexpressionsprofile (d) in der Niere von mRenTG- und ZSF1-Ratten im Vergleich zu publizierten Tiermodellen für AA-induzierter Nephropathie und GN. Alle Profile wurden mit Affymetrix Mikroarrays gemessen. Es ist die relative Genexpression in den L-NAME, AA oder NTS behandelten Ratten oder fettleibigen Tieren verglichen mit dem arithmetischen Mittelwerte der entsprechenden Kontrollen gezeigt. Die Genexpressionsprofile dieser Gengruppen sind als Heatmap dargestellt, nach hierarchischem Clustering mit euklidischer Metrik als Distanzmaß. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester. Cpto: Captopril. Min.: Minimale. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. SD: Sprague-Dawley-Ratten. HK: Hauptkomponente. W: Woche. NTS: Nephrotoxisches Serum. AA: Aristolochiasäure. GN: Glomerulonephritis. ND: Niedrige Dosis. MD: Mittlere Dosis. HD: Hohe Dosis. ROS: Reaktive Sauerstoffspezies. DNA: Desoxyribonukleinsäure. EMT: Epitheliale-Mesenchymale Transition. EZM: Extrazelluläre Matrix. OvL: Fettleibig relativ zu schlank.

Der zweite Parameter HK2 beschreibt 9,3 % der Variabilität in der Genexpression zwischen den Studien. Basierend auf HK2 wurden dabei für alle Tiermodelle die Tiere mit Nierenschäden von den gesunden Kontrolltieren getrennt. Im ZSF1-Rattenmodell wurden dabei die fettleibigen Tiere entsprechend ihres Alters gruppiert. Der Unterschied zwischen den Studien war dabei deutlich stärker ausgeprägt als innerhalb einer Gruppe und Studie. Insgesamt beschreibt somit die zweite Hauptkomponente (HK2) die Änderungen der renalen Genexpression aufgrund von CKI. Deutlich deregulierte und gut annotierte Gene wurde einer manuellen, literaturbasierten Annotation unterzogen (Abbildung 14a). 391 annotierte Gene mit veränderter Genexpression in ZSF1-Ratten zeigten dabei vergleichbare Profile in den mRenTG-, AA- und Glomerulonephritis-Tiermodellen. (Abbildung 14c). Diese Veränderungen der Genexpression waren überwiegend mit einer reduzierten Nierenfunktion einschließlich reduziertem renalen Transport, reduziertem Metabolismus, einer Entzündungsreaktion mit erhöhter Infiltration von Immunzellen und Konzentration von Zytokinen und Chemokinen, einer erhöhten renalen Fibrose einschließlich EZM Produktion und EMT, einer veränderten oxidativen Stressantwort und glomerulären Schäden assoziiert. In den ZSF1-Tieren waren diese Effekte bereits in 26 Wochen alten Tieren deutlich sichtbar und stiegen bis Woche 59 weiter an. Die Intensität der Genexpressionsveränderungen in 26 Wochen alten ZSF1-Tieren war dabei vergleichbar zum mRenTG-Rattenmodell. Eine veränderte Expression von Genen, welche bekanntermaßen mit der Produktion und dem Beladen von Exosomen oder Mikrovessikel, dem intrazellulärem Vesikeltransport oder deren Sekretion involviert sind, konnte in ZSF1- und mRenTG-Ratten nicht festgestellt werden.

Insgesamt 1613 Gene waren jeweils in nur einem Tiermodell signifikant dereguliert (Anhang-Abbildung 31). Eine Auswahl von 418 annotierten Genen ist in Abbildung 14d dargestellt. In den hier verwendeten Datensätzen war nur in 46 und 59 Wochen alte

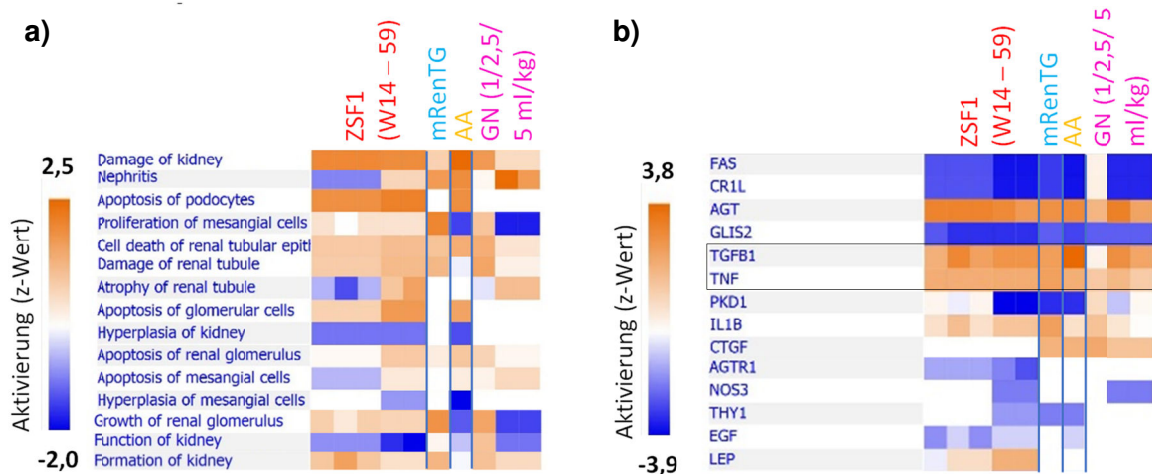
ZSF1-Ratten eine reduzierte oxidative Phosphorylierung und Fettsäureoxidation, sowie eine erhöhte mitochondriale Dysfunktion auf Genexpressionsebene erkennbar. Genexpressionsveränderungen, welche mit Entzündungsprozessen assoziiert sind, waren ebenfalls stärker in diesen Tieren ausgeprägt als in den anderen Tiermodellen. Speziell in AA-behandelten Ratten wurde eine deutlich stärkere Induktion von Genen mit Assoziation zur Entgiftung von ROS und DNA-Reparatur entsprechend der genotoxischen Aktivität von AA, sowie mit Assoziation zu glomerulären Schäden detektiert. Im Glomerulonephritis-Rattenmodell waren zusätzliche Gene signifikant verändert, welche mit glomerulären Schaden assoziiert waren. Eine Auswahl deregulierter Gene und deren Verbindung zur renalen Pathologie sind in Tabelle 18 dargestellt.

**TABELLE 18: AUSWAHL ANNOTIERTE GENE UND DEREN ASSOZIATION MIT RENALEN PATHOMECHANISMEN IN DER NIERE DER ZSF1-, MRENTG, GLOMERULONEPHRITIS- UND AA NEPHROPATHIE-RATTENMODELE**

Auswahl manuell annotierter Gene (Pubmed, Google scholar) mit veränderten renalen Genexpressionsprofilen in fettleibigen und schlanken, 14 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten (W22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die aufgelisteten Pathomechanismen wurden von den assoziierten Genen unter Berücksichtigung der Richtung ihrer veränderten Expression abgeleitet. EMT: Epitheliale-Mesenchymale Transition. EZM: Extrazelluläre Matrix. GBM: Glomeruläre Basalmembran. OXPPOS: Oxidative Phosphorylierung.

Pathomechanismus	Genselektion
Fibrose	<u>EMT</u> : Vim, Acta2, Tgfb1, Itga11, Adam12, Pxdn, Fgf2, Smoc2, Spp1, Cnn2, Tpm1, Hmgcs2, Runx1, Sfrp1, Sfrp4, <u>EZM-Synthese</u> : Fn1, Lox, Tgfb1, Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col5a1, Col5a2, Col6a1, Dse, Fbn1, Mmp14, Mmp2, Pcolce
Entzündung	<u>Präsenz von Immunzellen</u> : Itgae, Itgal, Hopx, Cd4, Cd5, Cd22, Cd19, Cd7, Cmtm3, Dapp1, Fcer2, Fcgr3a, Lcp1, Tcrb, Il7r, Rt1-Ba, Rt1-Da, <u>Zytokine/Chemokine</u> : Ccl2, Ccl19, Ccl20, Ccl21, Ccl5, Ccl7, Ccl6, Ccl3, Cx3cl1, Cxcl10, Cxcl12, Cxcl13, Cxcl9, Cxcl16, Il18, Il19, Il1b, Il24, Il7
Oxidative Stress (-antwort)	Gclc, Gclm, Ggct, Ggt1, Glrx, Gpx1, Gpx2, Gpx8, Gsta1, Gsta4, Gsta5, Gstk1, Gstm1, Gstm3, Gstm7, Gsto1, Gsto2, Gstt1, Mgst3, Gss, Slc25a21, Clic1, Msra, Msrb1, Mt1a, Ncf1, Ncf2, Nox4, Sepp1
Glomeruläre Schäden	<u>Podozyten</u> : Nphs1, Nphs2, Des, Grem1, Nfatc1, Kmo, Pcdh17, Cdh3, Itga3, Cd151, Cldn1, Tlr8, Podxl <u>EZM/GBM</u> : Col4a1, Col6a2, Col6a3, Col6a5, Col6a6, Lamb1, Lamb3, Lamc2, Nid1, Npnt, Agrn
Fettsäureoxidation	Abcd3, Etfdh, Acad10, Acad11, Acadm, Acads, Acsm3, Decr2, Echs1, Ehhadh, Hacl1, Acsl1, Mlycd, Acadsb, Acaa2, Acox1
Mitochondriale (Dys)Funktion	<u>OXPPOS</u> : Ndufa1, Ndufa11, Ndufa6, Ndufb2, Ndufb3, Ndufb6, Ndufs1, Ndufs3, Ndufv1, Atp5e, Atp5o, Acn9, Etfdh, Uqcrcq, Sdhc <u>Transporter</u> : Mpc1, Mpc2, Sfxn2, Nme4, Slc25a30, Slc25a42, Slc22a8, Slc44a1, Ucp2 <u>Mitophagie, Apoptose</u> : Nipsnap1, Pink1, Shc1, Ppif, Nme4, Cycs
Zirkadianer Rhythmus	Ccrn4l, Arntl, Hlf, Per2, Per3, Dbp, Nr1d1, Nr1d2, Usp2

Im Rahmen einer IPA-basierten Identifikation von übergeordneten Regulatoren, beeinflussten kanonischen Signalwegen und Funktionen der deregulierten Gene in biologischen und toxikologischen Prozessen wurden in allen Tiermodellen und allen Altersstufen der ZSF1-Tiere die übergeordneten Regulatoren Tgf- $\beta$ 1 und Tumor Nekrose-Faktor alpha (Tnf) als aktiviert vorhergesagt (Abbildung 15, Tabelle 19).



**ABBILDUNG 15: IPA-ANALYSE DER NIERE IN ZSF1- UND mRenTG-RATTEN UND RATTENMODELLEN AA-INDUZIERTER NEPHROPATHIE UND GLOMERULONEPHRITIS**

IPA-basierte Analyse in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME (n=5) sowie in fettleibigen und schlanken 14, 22, 26, 46 und 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (W14/22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die Ergebnisse wurden mit publizierten Datensätzen von AA-behandelten Ratten (n=6) und durch drei verschiedene Konzentrationen NTS-induzierter GN (NTS: n=5; Kontrollen n=3) verglichen. a) Tox und Bio-Funktionen. b) Übergeordnete Regulatoren. Für die Analyse wurden nur im jeweiligen Tiermodell signifikant deregulierte Gene verwendet (Welch/nAnova  $p \leq 0,05$ ; Effektgröße  $> 1,7$ ; minimale Signalstärke 20). IPA-Ergebnisse mit einem Aktivierungsgrad (z-Wert) von  $z \leq -2/ \geq 2$  mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,005$  wurden als signifikant bewertet. W: Woche. mRenTG: Renin2-transgene Ratten. AA: Aristolochiasäure. GN: Glomerulonephritis.

Für 14 bis 59 Wochen alte, fettleibige ZSF1-Ratten wurden eine erhöhte glomeruläre Schädigung, renale Nekrose, Dysfunktion der Niere und Apoptose von Podozyten vorhergesagt (Tabelle 19). Lediglich die Nierennekrose wurde auch für mRenTG-Ratten nach L-NAME Behandlung vorhergesagt. Die anderen identifizierten Tox- und Biofunktionen waren spezifisch für die ZSF1-Ratten.

**TABELLE 19: IPA-ANALYSE DER RENALEN GENEXPRESSION IN ZSF1-RATTEN**

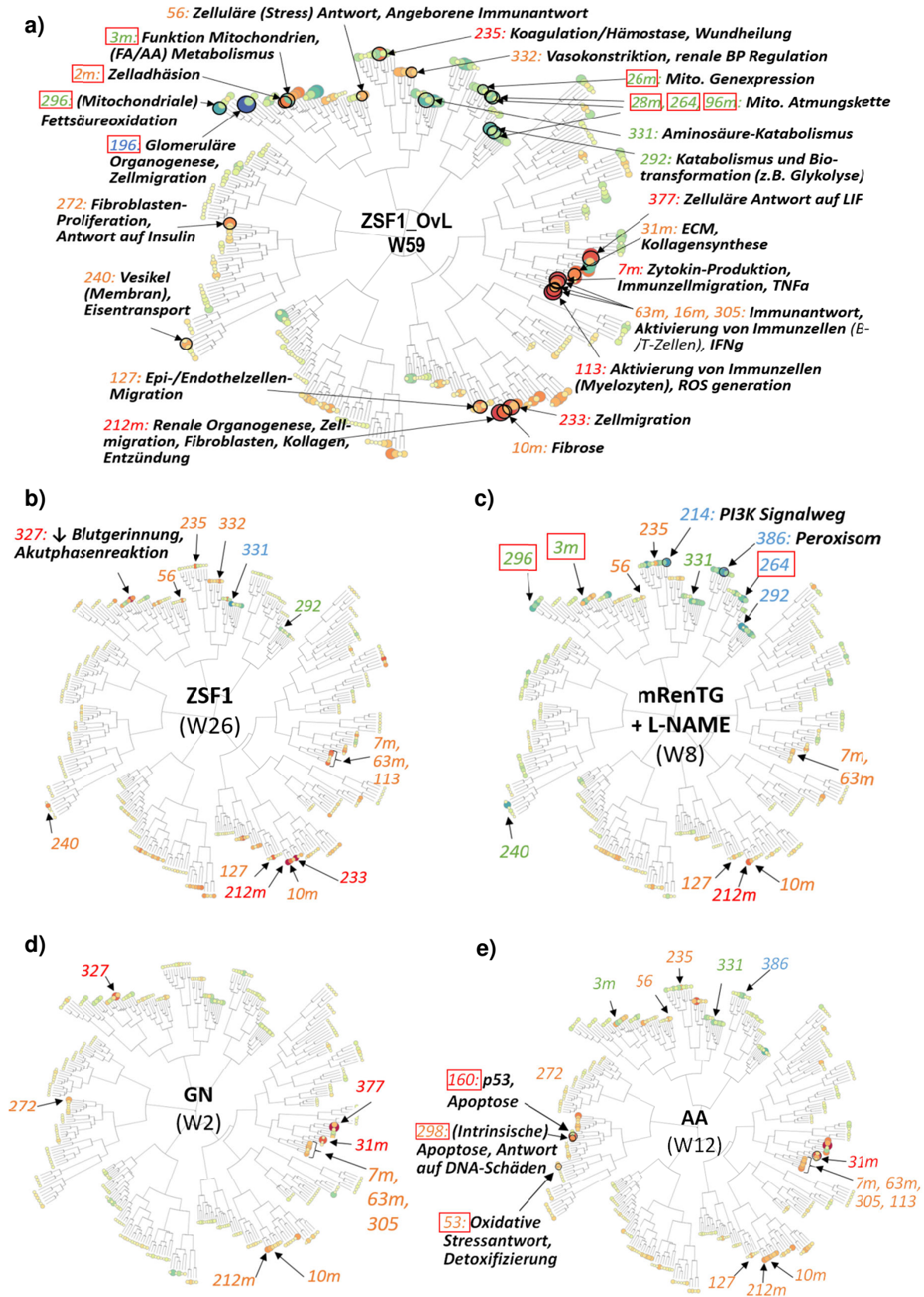
IPA-basierte Identifikation von Regulatoren, kanonischen Signalwegen und Tox- und Bio-Funktionen im veränderten renalen Genexpressionsprofil von fettleibigen und schlanken, 14 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten (W22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Für die IPA-Software wurden Vorhersagen mit Aktivierungswerten (z-Scores) von  $z \leq -2 / \geq 2$  mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,005$  verwendet ( $\uparrow$ : z-score positiv, Aktivierung vorhergesagt.  $\downarrow$ : z-score negativ, Inhibierung vorhergesagt).

<b>ZSF1-Ratten</b> (vs schlanke ZSF1-Ratten)	
<b>Regulatoren</b>	Glis2 ( $\downarrow$ ), Tnf ( $\uparrow$ ), Tgfb1 ( $\uparrow$ ), Agt ( $\uparrow$ ), Agtr1 ( $\downarrow$ ), Lep( $\uparrow$ ), Ctnnb1 ( $\uparrow$ )
<b>Kanonische Signalwege</b>	Integrin Signalweg ( $\uparrow$ ), Th1 Signalweg ( $\uparrow$ ), Oxidative Phosphorylierung ( $\uparrow$ ), Produktion von NO durch Makrophagen ( $\uparrow$ ), Akut-Phase-Reaktion ( $\uparrow$ ), Glutathion-vermittelte Detoxifizierung ( $\downarrow$ ), $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren ( $\downarrow$ ), Extravasation von Immunzellen ( $\uparrow$ ), Endothelin -1 Signalweg ( $\uparrow$ ), Renin-Angiotensin Signalweg ( $\uparrow$ )
<b>Tox- und Bio-Funktionen</b>	Glomeruläre Schädigung ( $\uparrow$ ), Renale Nekrose ( $\uparrow$ ), Renale Dysfunktion ( $\uparrow$ ), Funktion der Niere ( $\downarrow$ ), Apoptose von Podozyten ( $\uparrow$ )

Ähnlich zu den Regulatoren und Tox- und Bio-Funktionen waren auch die vorhergesagten kanonischen Signalwege in der Niere aller Tiermodelle vergleichbar. Lediglich für das mRenTG-Rattenmodell wurden insgesamt deutlich weniger aktivierte oder inhibierte Signalwege vorhergesagt (Anhang-Abbildung 32). Hierzu gehörten eine reduzierte Glutathion-vermittelte Entgiftung sowie ein aktivierter Endothelin-1 Signalweg, eine induzierte Extravasation von Immunzellen, eine aktivierte Akut-Phase-Reaktion und eine vermehrte Aktivierung Immunzell-spezifischer Signalwege.

Die Genexpressionsdaten wurden des Weiteren einer WGCNA unterzogen. Für eine Erläuterung der WGCNA und der dazugehörigen Darstellung siehe Kapitel 4.2.2. In 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Tieren wurden in der WGCNA Module identifiziert, welche mit renaler Inflammation (Module 212m, 113, 63m, 16m, 305, 7m, 56) und Fibrose (Module 212m, 10m, 31m, 272) assoziiert waren (Abbildung 16b). Die positiven EGS beschrieben dabei eine überwiegende Induktion der assoziierten Gene. Vergleichbare Effekte wurden in einer stärkeren Ausprägung in 59 Wochen alten Tieren beobachtet (Abbildung 16a). In 59 Wochen alten ZSF1-Ratten wurden zusätzlich Module identifiziert, welche mit mitochondrialer Funktion (Module 28m, 264, 96m), mitochondrialem Fettsäuremetabolismus (Module 3m, 296) oder glomerulärer Organogenese (Modul 196) assoziiert waren. Alle Module mit mitochondrialer Assoziation wurden dabei als inhibiert vorhergesagt. In L-NAME behandelten mRenTG-Ratten wurden ebenfalls Module mit Assoziation zu Mitochondrien (Module 296, 3m, 264), Entzündung und Fibrose (Module 7m, 63m, 305, 113, 212m, 10m, 31m) identifiziert. Die Größe der EGS war dabei vergleichbar mit 26 Wochen alten ZSF1-Ratten.





**ABBILDUNG 16: ERGEBNISSE DER WGCNA-ANALYSE IN DER NIERE VON ZSF1-RATTEN, MRENTG-RATTEN UND JE EINEM TIERMODELL FÜR GLOMERULOSKLEROSE UND AA-INDUZIERTER NEPHROPATHIE**

Relevante Module, welche in der WGCNA für a) 26 und b) 59 Wochen alte ZSF1-Ratten (W26: n=10; W59: n=6), in c) für mRenTG-Ratten nach achtwöchiger L-NAME Behandlung (n=5), d)

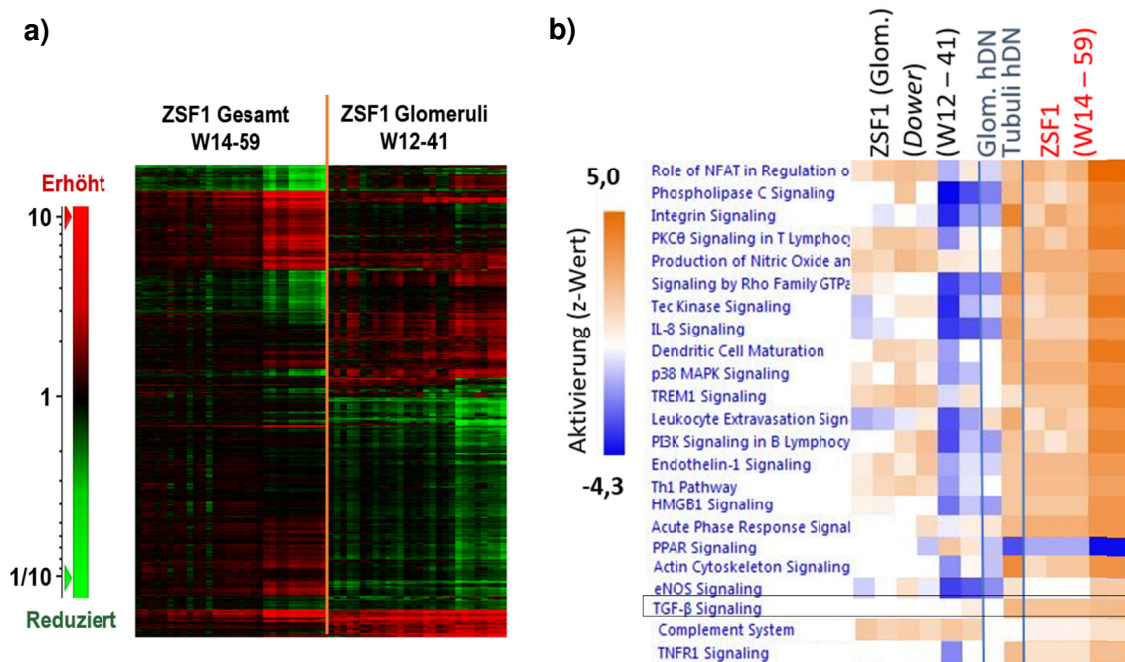


Ratten nach zweiwöchiger NTS-Behandlung zur Induktion von Glomerulonephritis (NTS: n=5; Kontrollen n=3) und in e) Ratten nach 12-wöchiger Behandlung mit AA (n=6) identifiziert wurden. Für die Analyse wurden Mittelwerte signifikant deregulierte Gene in den angegebenen Gruppen verglichen zu den entsprechenden Kontrollen verwendet (Welch/nAnova  $p \leq 0,05$ ; Effektgröße  $> 1,7$ ; minimale Signalstärke 20). Module mit einem positiven EGS sind in orange und rot dargestellt, Module mit einem negativen EGS in grün und blau. Die funktionelle Annotation erfolgte durch Gene Ontology-Überrepräsentationsanalyse. Die WGCNA wurde in der TXG-MAPr Webapplikation durchgeführt. Durch Umrandung sind Module in 59 Wochen alten ZSF1-Ratten und mRenTG-Ratten mit mitochondrialer oder glomerulärer Assoziation hervorgehoben, in AA-behandelten Ratten Module mit Assoziation zu oxidativem Stress, Apoptose und DNA-Schäden. W: Woche. mRenTG: Renin2-transgene Ratten. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester.

Module mit Assoziation zu Entzündung und Fibrose wurden auch in L-NAME behandelten mRenTG-Ratten (Abbildung 16c) und in den Rattenmodellen für Glomerulonephritis und AA-induzierter Nephropathie gezeigt (Abbildungen 16d und 16e). Spezifisch für AA-induzierte Nephropathie war die Induktion von Modulen mit Assoziation zu p53, Apoptose und Antwort auf DNA-Schäden.

Für den Vergleich der renalen Genexpression in ZSF1-Ratten mit humaner DN wurden die Genexpressionsdaten der ZSF1-Ratten mit einer Studie von Woroniecka et al (2011) verglichen, in der die Genexpression in Tubuli und Glomeruli von Patienten mit DN bestimmt wurden (Woroniecka et al. 2011). Zusätzlich wurden Daten von Dower et al (2017) in den Vergleich eingeschlossen, welche die renale Genexpression in glomerulusangereichertem Nierengewebe von 12 bis 41 Wochen alten ZSF1-Tieren beschreiben. Diese Meta-Analyse soll zeigen, ob die renale Genexpression der ZSF1-Ratten die humane Genexpression widerspiegelt und ob die in dieser Arbeit erfassten Daten aus einem Gesamthomogenat der Niere vermehrt die Genexpression im tubulären oder glomerulären Zelltyp repräsentieren.

Der Vergleich zeigte, dass sowohl die Genexpressionsprofile im Gesamthomogenat vom glomerulusangereicherten Gewebe von ZSF1-Ratten stark abwichen als auch von der humanen Genexpression in Glomeruli (Abbildung 17a, Anhang-Abbildung 33). Die Analyse von aktivierten oder inhibierten Signalwege im Nierengewebe zeigte allerdings, dass die Vorhersagen für das Gesamthomogenat der ZSF1-Ratten mit den vorhergesagten Signalwegen im Tubulus von Patienten mit DN vergleichbar sind (Abbildung 17b). Währenddessen entsprachen Daten von Dower et al (2017) der Genexpression humaner Glomeruli. Zum Beispiel wurde eine Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalweges in Tubuli von DN Patienten und im Gesamthomogenat von ZSF1-Ratten vorhergesagt, während keine Aktivierung in den Glomeruli der Ratten oder Patienten identifiziert werden konnte.



**ABBILDUNG 17: GENEXPRESSION IN DER NIERE IN ZSF1- RATTEN UND GLOMERULI UND TUBULI VON PATIENTEN MIT DIABETISCHER NEPHROPATHIE**

a) Genexpressionsprofile und (b) durch IPA identifizierte kanonische Signalwege im Gesamthomogenat der Niere von 14 bis 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (Gesamt: W14/22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die Ergebnisse wurden mit einem publizierten Datensatz mit Genexpressionsdaten aus 12 bis 41 Wochen alten ZSF1-Ratten im Nierengewebe nach Anreicherung der Glomeruli (n=5) und mit publizierten Genexpressionsanalysen in Tubuli und Glomeruli von Patienten mit DN (Woroniecka et al, 2011; n=5 (Glomeruli), n=8 (Tubuli)) verglichen. Die Genexpression im Gesamthomogenat wurde mit Hilfe von Affymetrix Mikroarrays, die Genexpression nach Anreicherung der Glomeruli mittels RNA-Sequenzierung bestimmt. Es ist die relative Genexpression in fettleibigen ZSF1-Ratten relativ zum arithmetischen Mittelwerte der entsprechenden Kontrollen gezeigt. Genexpressionsprofile sind dargestellt als Heatmap einschließlich hierarchischem Clustering. Für die IPA-Analyse wurden signifikant deregulierte Gene verwendet (Welch/nAnova  $p \leq 0,05$ ; Effektgröße  $> 1,7$ ; minimale Signalstärke 20). IPA-Ergebnisse mit einem Aktivierungsgrad (z-Wert) von  $z \leq -2/ \geq 2$  und  $p \leq 0,005$  wurden als signifikant bewertet. Positive z-Werte, dargestellt in orange, stellen eine vorhergesagte Aktivierung dar, negative z-Werte, dargestellt in blau, stellen eine Inhibierung oder Reduktion dar. hDN: humane diabetische Nephropathie. W: Woche. Glom.: Glomeruliangereichert. Gesamt: Gewebehomogenat der gesamten Niere.

Zusammengefasst deuten die renalen Genexpressionsdaten in ZSF1-Ratten auf eine bereits in Woche 26 ausgeprägte und bis Woche 59 weiter ansteigende Entzündung, Fibrose, glomeruläre Schädigung, oxidative Stress Antwort und renale Dysfunktion hin. Die aktivierten und inhibierten Signalwege in den Glomeruli älterer ZSF1-Tiere entsprach dabei den Signalwegen in Glomeruli von Patienten mit DN, während die Genexpressionsdaten dieser Arbeit den tubulären Zelltyp in humaner DN bereits in jüngeren Tieren widerspiegeln. Der Vergleich der CKD in ZSF1-Tiere mit sub-chronischen (mRenTG, AA) und sub-akuten (Glomerulonephritis) Nierenschäden zeigte zum größten Teil vergleichbare Veränderungen der renalen Genexpression.

### **4.3 MicroRNA-Quantifizierung im Urin von ZSF1- und mRenTG-Ratten und in einem *in vitro*-Modell für renale Fibrose**

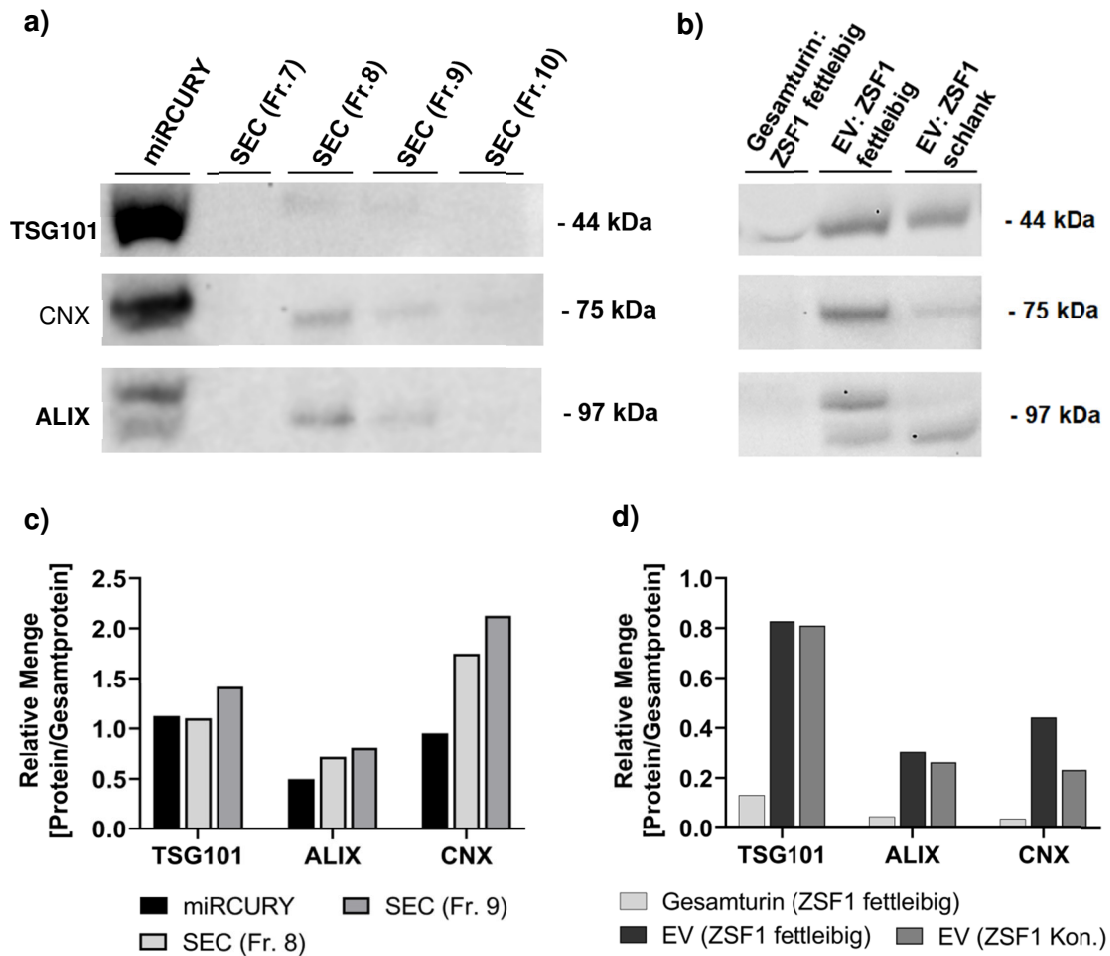
MiRNAs in Gesamturin oder in Urin-EVs werden als potenzielle neue Biomarker für Nierenschädigung und deren zugrundeliegenden Pathomechanismen diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits ein ausgeprägter renaler Schaden in ZSF1- und mRenTG-Ratten durch histopathologische Untersuchungen, klassische und neuere Proteinbiomarker für Nierenschäden (Kapitel 4.1) sowie Genexpressionsanalysen (Kapitel 4.2) gezeigt. In diesem Teil soll nun analysiert werden, ob und inwiefern CKD in beiden Rattenmodellen das miRNA-Profil im Gesamturin und Exosomen des Urins beeinflusst, und ob vergleichbare Veränderungen auch in Tiermodellen wie dem Glomerulonephritis-Modell beobachtet werden können. Eine Übersicht über alle verwendeten Studien ist in Anhang-Abbildung 34 gezeigt. Durch eine Analyse der miRNA-Freisetzung in einem *in vitro*-Modell für renale Fibrose soll zusätzlich ein Zusammenhang zwischen veränderten miRNAs im Urin und dem Prozess der TGF- $\beta$  vermittelten Fibrose ausgehend von proximalen Tubuluszellen untersucht werden.

#### **4.3.1 MicroRNA-Profil in Urin und Niere von ZSF1-Ratten**

##### **4.3.1.1 Isolation und Semi-Quantifizierung von Exosomen im Urin**

Um eine passende Methode zur Exosomenanreicherung aus Rattenurin bezüglich Aufwand und Qualität auszuwählen, wurden zwei Methoden mit unterschiedlichen Isolationsprinzipien verglichen: Das auf Präzipitation basierende *miRCURY Exosome Isolation Kit* und die auf dem Prinzip einer Größenausschlusschromatographie (SEC) beruhenden qEV-Säulen. Hierzu wurden über beide Methoden Exosomen aus dem Urin fettliebiger ZSF1-Ratten angereichert und die Exosomen-assoziierten Proteine TSG101 und Alix mittels Western Blot quantifiziert. Die Ko-Isolation von Mikrovesikeln wurden anhand des Proteins Calnexin bestimmt. Das *miRCURY Exosome Isolation Kit* reicherte deutlich messbare Mengen Gesamtprotein (Anhang-Tabelle 28), der exosomalen Proteine TSG101 und ALIX und des mikrovesikulären Proteins Calnexin an (Abbildung 18a). Für die qEV-Säulen bestätigte die Western Blot Analyse die Anreicherung exosomaler Proteine in den vom Hersteller angegebenen Elutionsfraktionen 8 und 9. Verglichen mit dem *miRCURY* Kit resultierten die qEV-Säulen dabei allerdings in deutlich niedrigeren, absoluten Intensitäten exosomaler und mikrovesikulärer Proteine (Abbildung 18a). Der Gesamtproteingehalt lag für alle Fraktionen der qEV-Säulen unter dem Detektionslimit des BCA-Tests

(Anhang-Tabelle 28). Bezogen auf den Gesamtproteingehalt der aufgetragenen Probe, gemessen nach Coomassie-basierter Färbung der Gele, war der Anteil der exosomalen Proteine TSG101 und ALIX in den SEC Fraktionen 8 und 9 vergleichbar bis minimal erhöht gegenüber der miRCURY-Methode (Abbildung 18c, Anhang-Tabelle 28). Relativ zum Gesamtproteingehalt der Probe war die Ko-Isolation von Mikrovesikeln in SEC-Fraktionen 8 und 9 dabei um das Zweifache höher verglichen zur miRCURY-Methode.



#### ABBILDUNG 18: QUANTIFIZIERUNG EV-ASSOZIIERTER PROTEINE IM URIN VON ZSF1-RATTEN

Western Blot Analyse der exosomalen Proteine TSG101 und Alix, und des mikrovesikulären Proteins Calnexin in EV-angereicherten Urinproben von ZSF1-Ratten (Alter: 26 Wochen). a) Exosomale und mikrovesikuläre Proteinintensitäten einschließlich c) densitometrische Analyse nach Isolation von Exosomen aus 1 ml Urin fettleibiger ZSF1-Ratten (4 Tiere gepoolt) mittels des *miRCURY Exosome Isolation Kits* (Qiagen) oder qEV-Säulen (Fraktionen 7 bis 10; Izon). b) Exosomale und mikrovesikuläre Proteinintensitäten im Western Blot einschließlich d) densitometrische Analyse nach Isolation von Exosomen aus 1 ml Urin fettleibiger und schlanker ZSF1-Ratten (je 4 Tiere gepoolt) mittels des *miRCURY Exosome Isolation Kits* (Qiagen) oder im Gesamturin. Je 16,25  $\mu$ L EV-Probe (aus 1 ml Urin) oder 100  $\mu$ L Gesamturin wurden verwendet. Proteinintensitäten der densitometrischen Auswertung wurden auf den Gesamtproteingehalt normalisiert. Der Gesamtproteingehalt wurde mit Hilfe von Intensitätsbestimmung aller Banden pro Probe nach Coomassie-basierter Proteinfärbung bestimmt. MV: Mikrovesikel. EV: Extrazelluläre Vesikel. Fr: Elutionsfraktion. SEC: Größenausschlusschromatographie. CNX: Calnexin. Kon.: Kontrolle.

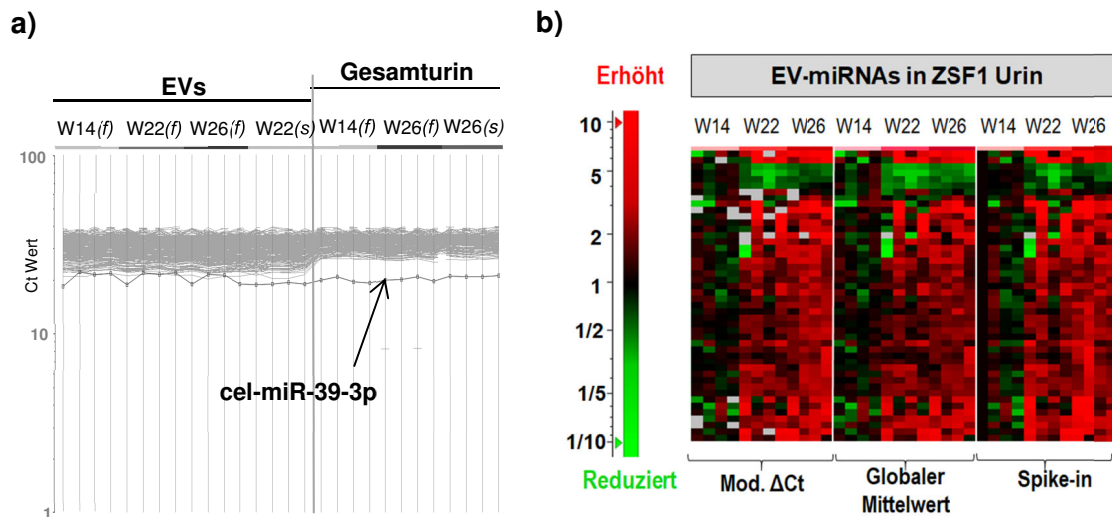
In einem zweiten Western Blot wurde die Menge exosomaler und mikrovesikulärer Proteine in Gesamturin sowie EV-Präparaten von fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten verglichen. In Gesamturin fettleibiger ZSF1-Tiere wurden lediglich sehr niedrige Mengen des exosomalen Proteins TSG101 detektiert, während die Proteinintensität von ALIX und Calnexin nahe des Hintergrundwertes lagen (Abbildung 18b). Im Vergleich dazu war die auf Gesamtprotein normalisierte Signalintensität der exosomalen und mikrovesikulären Proteine nach Anreicherung der Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten deutlich höher (Abbildungen 18b und 18d). Beachtet werden muss bei dieser Betrachtung, dass die Probenmenge des Gesamturins, welche für den Western Blot verwendet wurde, nur circa 10 % des Volumens entspricht aus dem die EVs angereichert wurden. Dennoch bestätigen die Ergebnisse, dass EV-Anreicherung aus Urin die Konzentration von EVs deutlich erhöht und eine gezieltere Analyse der EVs ermöglicht.

Zusammenfassend bestätigten diese Western Blot-Analysen die erfolgreiche Anreicherung von Exosomen aus dem Urin fettleibiger ZSF1-Ratten für beide Methoden. Aufgrund der parallelen Ko-Isolation von Mikrovesikeln werden die entsprechenden Urinpräparationen im Rest der Arbeit allerdings als „EV angereicherte“ Urinpräparate bezeichnet. Dieser Ansatz folgt den Empfehlungen der *International Society for Extracellular Vesicles* (Gould und Raposo 2013). Aufgrund der generell höheren EV-Ausbeute und der prozentual etwas geringeren Ko-Isolation mikrovesikulärer Bestandteile wurde für weitere Versuche zunächst das miRCURY Kit verwendet, während die qEV-Säulen zur Bestätigung der miRCURY-basierten Ergebnisse durch eine Quantifizierung ausgewählter miRNAs verwendet wurde. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass im Urin fettleibige ZSF1-Ratten leicht erhöhte Mengen der exosomalen Proteine TSG101 und Alix, und deutlicher erhöhte Mengen des mikrovesikulären Proteins Calnexin verglichen zur schlanken Kontrolle vorhanden waren.

#### **4.3.1.2 Quantifizierung von microRNAs im Urin von ZSF1-Tieren**

In diesem Teil der Arbeit wurden miRNA Veränderungen im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten charakterisiert und der Mehrwert einer EV-Anreicherung für die Detektion von potenziellen miRNA Biomarkern für CKD und deren Krankheitsprogression adressiert. Hierzu wurden miRNAs aus Gesamturin und Urin-EVs quantifiziert und deren Profile in fettleibigen Tieren verglichen zur schlanken Kontrollen und in fettleibigen Ratten über die Zeit analysiert. Für die Quantifizierung wurden miRNAs ausgewählt, für welche eine Expression in der Niere beschrieben wurde und welche potenziell mit einer renalen

Schädigung assoziiert sein könnten. Die PCR-basierte parallele Quantifizierung von 374 miRNAs („Profiling“) in ZSF1-Tieren ergab 337 messbare miRNAs im Gesamturin und Urin-EVs (Abbildung 19a, Anhang-Tabelle 30). Die geringe Varianz des Spike-ins zwischen den Proben bestätigte dabei eine akzeptable technische Varianz während der RNA-Isolierung, reversen Transkription und qRT-PCR (Abbildung 19a).



**ABBILDUNG 19: miRNA CT-WERTE UND VERGLEICH DREI VERSCHIEDENER miRNA NORMALISIERUNGSMETHODEN IM URIN VON ZSF1-RATTEN**

a) Ct-Werte von 374 miRNAs und des spike-ins cel-miR-39-3p im Gesamturin und in Urin-EVs fettleibiger und schlanker ZSF1-Ratten (n=4). b) Hierarchisches Clustering ausgewählter miRNAs in Urin-EVs von ZSF1-Ratten (n=4) nach Auswertung mittels der modifizierten  $\Delta$ Ct-Methode, der globalen Mittelwert-Methode oder nach Normalisierung auf den spike-in cel-miR-39-3p. Es sind relative Mengen in fettleibigen ZSF1-Ratten im Alter von 22 und 26 Wochen relativ zum Mittelwert 14 Wochen alter, fettleibigen ZSF1-Tieren gezeigt. Die Ergebnisse sind in Form einer Heatmap dargestellt. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (Qiagen) quantifiziert. Für die Auswahl von miRNAs wurden folgende Grenzwerte verwendet: zweifacher ANOVA p-Wert  $\leq 0,05$  nach Korrektur mittels FDR, kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$ -fach. OvL: Fettleibig relativ zu schlank. W: Woche. f: Fettleibig. s: Schlank. EV: Extrazelluläre Vesikel.

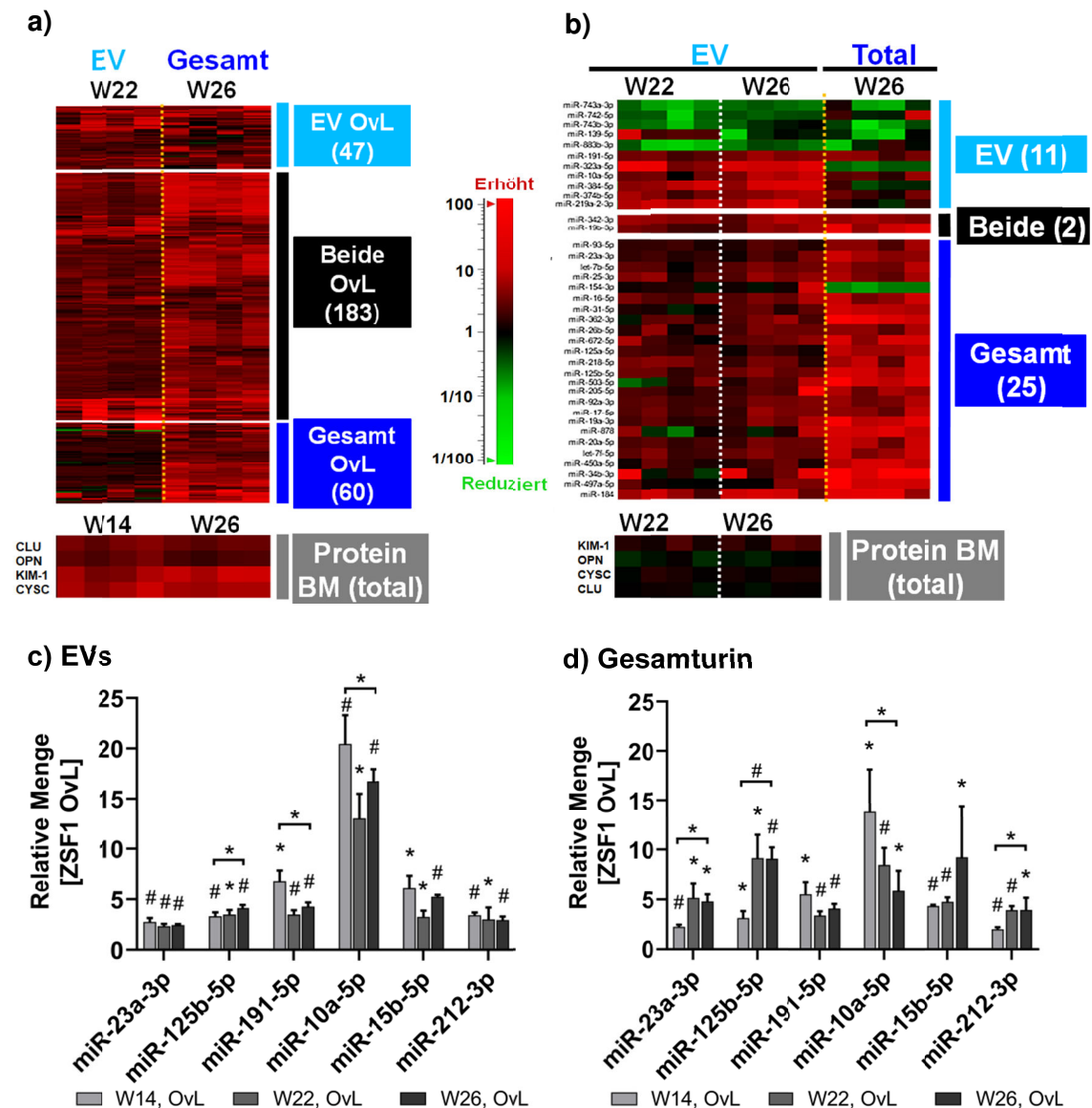
Wie zuvor beschrieben gibt es bislang kein Standardverfahren zur Normalisierung der miRNA-Messdaten in Körperflüssigkeiten, diese können die Ergebnisse von miRNA-Quantifizierungen jedoch deutlich beeinflussen. Daher wurden drei Normalisierungsmethoden von miRNAs im ZSF1-Urin verglichen: Die Normalisierung auf den globalen Mittelwert, die *Spike-in* Normalisierung und die Normalisierung nach der modifizierten  $\Delta$ Ct-Methode (siehe Kapitel 1.4.3 und 3.5.3). Das Ergebnis für 46 repräsentative miRNAs in fettleibigen ZSF1-Ratten ist in Abbildung 19b dargestellt. Der Vergleich zeigte, dass alle detektierten miRNAs unabhängig von der Normalisierungsmethode vergleichbare Profile in den fettleibigen ZSF1-Ratten

zwischen Woche 14 und 26 zeigen. Für diese Arbeit wurde im Folgenden die modifizierte  $\Delta$ Ct-Methode nach Pavkovic et al für die miRNA Normalisierung gewählt. Die Auswertung nach der modifizierte  $\Delta$ Ct-Methode einschließlich statistischer Analyse des Profiling-Experiments zeigte, dass im Urin fettleibiger ZSF1-Tieren 290 der 337 detektierten miRNAs signifikant gegenüber den gleichaltrigen, schlanken Kontrolltieren verändert und größtenteils erhöht waren (Abbildung 20a, Anhang-Tabelle 31). 183 der 290 miRNAs waren dabei sowohl im Gesamturin als auch Urin-EVs von fettleibigen ZSF1-Tieren verändert (z.B. miR-130a-3p, miR-145-5p), während je 47 und 60 miRNAs nur in Urin-EVs oder in Gesamturin statistisch signifikant waren. Hinsichtlich der Progression der CKD zwischen 14 und 26 Wochen waren im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten 38 miRNAs signifikant verändert (Abbildung 20b, Anhang-Tabelle 32). Elf signifikante miRNAs wurden dabei spezifisch in der EV-angereicherten Fraktion detektiert, von denen fünf reduziert (z.B. miR-743a-3p, miR-883b-3p) und sechs erhöht waren (z.B. miR-191-5p, miR-10a-5p). Im Gesamturin waren 25 miRNAs signifikant zwischen dem Alter von 14 und 26 Wochen erhöht (z.B. miR-23a-3p, miR-125b-5p). Zwei miRNAs (miR-342-3p, miR-19b-3p) waren sowohl im Gesamturin als auch nach EV-Anreicherung signifikant erhöht. Diese Daten weisen darauf hin, dass sich miRNAs im Urin sowohl in fettleibigen verglichen zu schlanken ZSF1-Ratten, als auch in fettleibigen Ratten mit zunehmenden Alter verändern. Dies unterstreicht das Potential von miRNAs im Urin als mögliche Biomarker sowohl für CKD als auch für die Krankheitsprogression der CKD.

Zu den hier analysierten Zeitpunkten waren ebenfalls die Proteinbiomarker für Nierenschäden KIM-1, OPN, CLU und CYSC signifikant im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle erhöht (Abbildung 20a, untere Heatmap; Kapitel 4.1.3). Im Vergleich hierzu zeigten allerdings manche miRNAs einen größeren Effekt. So war zum Beispiel miR-34c-5p um das 28,1-fache erhöht im Gesamturin fettleibiger ZSF1-Tiere verglichen zur Kontrolle, während der entsprechende Wert für Proteinbiomarker bei maximal 9,3-fach für KIM-1 lag (siehe Kapitel 4.1.3, Anhang-Tabelle 26). Der Anstieg der miRNAs zwischen 14 und 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten war ebenfalls deutlich stärker ausgeprägt als die gemessenen Proteinbiomarker OPN, CYSC, CLU und KIM-1, von denen lediglich KIM-1 signifikant über die Zeit anstieg (Abbildung 20b, Kapitel 4.1.3). Dies könnte darauf hinweisen, dass im Urin miRNA den Krankheitsverlauf besser reflektieren als die Proteinbiomarker. Diese Annahme wird auch durch HKAs unterstützt (Anhang-Abbildung 36). Basierend auf ausgewählten miRNAs in Gesamturin oder Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Tiere konnten in der HKA sowohl die Gruppe der fettleibigen ZSF1-Tiere von den Kontrollen unterschieden werden, als auch die 14 von den 22 und 26



Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten. Die erste Hauptkomponente der jeweiligen Analyse beschrieb dabei 71,4% (EV-miRNAs) und 82,5% (miRNAs im Gesamturin) der Variation der Daten und reflektiert möglicherweise das Ausmaß des Nierenschadens und dessen Progression mit zunehmendem Alter. Die HKA basierend auf den vier Proteinbiomarkern hingegen konnte nur fettleibige ZSF1-Ratten von den Kontrolltieren unterscheiden, während keine Trennung der fettleibigen ZSF1-Ratten unterschiedlich Alters erreicht wurde.



**ABBILDUNG 20: VERÄNDERTE MIRNAS IM GESAMTURIN UND URIN-EVS VON ZSF1-RATTEN**  
 a) Hierarchisches Clustering signifikant veränderter miRNAs im Urin und Urin-EVs fettleibiger und schlanker ZSF1-Ratten im Alter von 22 oder 26 Wochen (n=4). Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur schlanken Kontrolle. Es sind relative Mengen in fettleibigen ZSF1-Ratten relative zum Mittelwert der Kontrolle in Form einer Heatmap gezeigt. b) Hierarchisches Clustering signifikant veränderter miRNAs im Urin und Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten im Alter von 14, 22 und 26 Wochen (n=4). Statistische Analyse erfolgte mittels



eines zweifachen ANOVA einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zu Woche 14. MiRNAs sind als Level in fettleibigen ZSF1-Tieren im Alter von 22 und 26 Wochen relativ zum Mittelwert 14 Wochen alter, fettleibiger ZSF1-Tiere in Form einer Heatmap dargestellt. MiRNAs wurden mit den Proteinbiomarkern KIM-1, OPN, CYSC und CLU im Gesamturin verglichen. Bestätigung ausgewählter miRNAs in c) Urin nach EV-Anreicherung und d) Gesamturin fettleibiger und schlanker ZSF1-Ratten ( $n=4$ ). Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifachem ANOVA einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur gleichaltrigen Kontrolle und über die Zeit. Es sind Mittelwerte fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur gleichaltrigen, schlanken Kontrolle einschließlich Standardabweichung gezeigt. Statistische Signifikanz ist als ANOVA \*  $p \leq 0,05$  oder #  $p \leq 0,001$  dargestellt. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta Ct$ -Methode einschließlich Kreatinin-Normalisierung ausgewertet. EV: Extrazelluläre Vesikel. OvL: Fettleibig relativ zu schlank. W: Woche. KIM-1: Kidney injury marker-1. OPN: Osteopontin. CYSC: Cystatin C. CLU: Clusterin. FDR: engl. *False discovery rate*. miR: microRNA. BM: Biomarker.

Sechs ausgewählte miRNAs wurden einer zweiten, ebenfalls miRCURY-basierten EV-Anreicherung und qRT-PCR unterzogen, um die Ergebnisse des ersten Profilings zu bestätigen. In der ersten Messung („Profiling“) waren miR-191-5p und miR-10a-5p in Urin-EVs 26 Wochen alter, fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zu 14 Wochen alten Tieren erhöht, während miR-23a-3p und miR-125b-5p im Gesamturin dieser Tiere erhöht waren. MiR-15b-5p war im Gesamturin und Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten, und miR-212-3p war im Gesamturin fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle erhöht. Weitere Kriterien bei der Selektion waren in der Literatur berichtete renale Expression (Chorley et al. 2021b). Die Ergebnisse der zweiten qRT-PCR bestätigten, dass alle sechs gemessenen miRNAs im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle erhöht sind (Abbildungen 20c und 20d). Der Anstieg von miR-10a-5p gegenüber zur schlanken Kontrolle war dabei nach EV-Anreicherung deutlich stärker verglichen zum Gesamturin, was darauf hindeutet, dass EV-Anreicherung vor der Detektion von miR-10a-5p potenziell von Vorteil ist. Der Anstieg von miR-10a-5p in fettleibigen ZSF1-Ratten mit zunehmendem Alter konnte hingegen nicht bestätigt werden. miR-125b-5p und miR-23a-3p stiegen im Gesamturin von fettleibigen ZSF1-Tieren verglichen zur schlanken Kontrolle und in fettleibigen ZSF1-Tieren mit zunehmendem Alter signifikant an. Der Effekt war dabei im Gesamturin deutlich ausgeprägter als nach EV-Anreicherung. Diese Beobachtungen bestätigen die initialen Ergebnisse aus dem miRNA-Profilings im Urin von ZSF1-Ratten. Für diese beiden miRNAs deuten die Ergebnisse darauf hin, dass diese miRNAs hauptsächlich im Gesamturin detektierbar sind und eine überwiegende EV-Assoziation oder ein Vorteil der EV-Anreicherung für die miRNA Detektion in diesem Tiermodell und Stadium der Nierenschädigung unwahrscheinlich ist. Der zuvor beobachtete signifikante Anstieg von miR-191-5p über die Zeit in fettleibigen ZSF1-Ratten nach EV-Anreicherung konnte in der zweiten qRT-PCR nicht bestätigt werden. miR-212-3p

hingegen zeigte einen leichten und signifikanten Anstieg im Gesamturin. Dieser Trend konnte im initialen Profiling zwar ebenfalls beobachtet werden, allerdings erreichte er hierbei keine statistische Signifikanz. MiR-15b-5p war in der zweiten Quantifizierung ebenfalls erhöht in Gesamturin und Urin-EVs fettleibiger Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle, während keine Veränderung zwischen dem Alter von 14 und 26 Wochen identifiziert wurde. Diese Ergebnisse bestätigten hiermit die Resultate des initialen Experiments.

**TABELLE 20: 12 AUSGEWÄHLTE miRNAs IM URIN VON ZSF1-RATTEN NACH EV-ANREICHERUNG MIT ZWEI EV-ISOLATIONSMETHODEN**

Quantifizierung von 12 miRNAs in Urin-EVs von 14, 22 und 26 Wochen alten, fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten (n=2, gepoolt). Statistische Analyse des miRCURY Experiments erfolgte mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur schlanken Kontrolle. Es sind relative Mengen einschließlich Standardabweichung fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur gleichaltrigen Kontrolle gezeigt. Statistische Signifikanz ist als \*  $p \leq 0,05$  dargestellt. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (miRCURY; Qiagen) oder individueller Assays (qEV; Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta\text{Ct}$ -Methode einschließlich Kreatinin-Normalisierung ausgewertet. EV: Extrazelluläre Vesikel. miR: microRNA.

	ZSF1 fettleibig vs. schlank		
	<i>miRCURY Exosome Isolation Kit</i>	qEV-Säulen	
miRNA	EV (Woche 22)	EV (Woche 14)	EV (Woche 26)
miR-10a-5p	2,21 ± 0,59*	6,34	3,94
miR-34a-5p	9,78 ± 2,02*	9,51	17,50
miR-125b-5p	3,15 ± 0,49*	1,93	5,32
miR-19b-3p	2,66 ± 0,45*	4,18	5,67
miR-16-5p	3,40 ± 0,51*	5,26	8,91
miR-15b-5p	3,40 ± 1,29*	6,16	8,02
miR-29c-3p	2,55 ± 0,39*	3,46	4,68
miR-191-5p	2,42 ± 0,34*	3,85	6,73
miR-25-3p	2,87 ± 0,81*	4,09	7,45
miR-30d-5p	2,36 ± 0,37*	2,65	4,45
miR-23a-3p	1,88 ± 0,14*	1,63	2,42
miR-200b-3p	3,26 ± 0,92*	7,48	24,90

Da verschiedene Publikationen gezeigt haben, dass die Methode der EV-Isolation einen großen Einfluss auf die Quantität und Profile von miRNAs haben kann (Buschmann et al. 2018)(siehe auch Kapitel 1.4.3 der Einleitung), wurden EVs zusätzlich mittels qEV-Säulen angereichert und 12 ausgewählte miRNAs erneut mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten in Übereinstimmung mit den vorherigen

Experimenten erhöhte miRNA-Mengen in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle (Tabelle 20, Abbildung 24a). Zudem wurde für die ausgewählten miRNAs eine mögliche EV-Assoziation beziehungsweise ein potenzieller Vorteil der EV-Anreicherung für die miRNA-Detektion bekräftigt.

Zusammenfassend zeigen die Daten sowohl eine große Anzahl von hauptsächlich erhöhten miRNAs im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle, als auch mehrere miRNAs, welche in fettleibigen Ratten mit zunehmendem Alter ansteigen und somit mit der Progression der CKD korrelieren könnten. Die EV-Anreicherung ermöglichte dabei die Identifikation einiger veränderten miRNAs, welche im Gesamturin nicht detektiert wurden. Die Veränderungen der miRNAs waren dabei sowohl verglichen zur gesunden Kontrolle als auch über die Zeit stärker ausgeprägt als die etablierten Proteinbiomarker für Nierenschäden.

#### ***4.3.1.3 miRNA-Expression in der Niere von ZSF1-Ratten***

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass zahlreiche miRNAs im Gesamturin und Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten verändert waren. Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob sich diese Veränderungen im Nierengewebe widerspiegeln. Hierzu wurde miRNA aus Nierengewebe von fettleibigen und schlanken ZSF1-Tieren isoliert und 15 ausgewählte miRNAs mittels qRT-PCR quantifiziert. Zusätzlich wurden parallel 420 miRNAs mittels der Nanostring-Technologie gemessen.

Während alle 15 getesteten miRNAs im Nierengewebe mittels PCR detektiert werden konnten (Anhang-Abbildung 35, Anhang-Tabelle 35), waren in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur Kontrolle lediglich miR-21-5p und miR-34a-5p signifikant erhöht, und miR-192-5p und miR-29c-3p signifikant reduziert (Tabelle 21). Die Quantifizierung mittels Nanostring-Technologie resultierte in vier signifikant veränderten miRNAs im Nierengewebe fettleibiger ZSF1-Ratten (Tabelle 21). In Übereinstimmung mit der qRT-PCR waren miR-192-5p und miR-29c-3p signifikant reduziert. Zusätzlich wurden erhöhte Mengen von miR-184 und miR-132 in der Niere fettleibiger ZSF1-Ratten identifiziert. MiR-34a-5p zeigte in der Nanostring-basierten Quantifizierung einen tendenziellen Anstieg in fettleibigen Ratten, im Gegensatz zur qRT-PCR erreichte dieser allerdings keine statistische Signifikanz. Zwischen Woche 14 und 26 stiegen nur die relativen Mengen von miR-21-5p und miR-184 in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle weiter an, und miR-192-5p und miR-29c-3p Mengen nahmen weiter ab. Die Veränderung von lediglich sechs miRNAs im Nierengewebe von

fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle steht somit in einem deutlichen Gegensatz zu den 290 veränderten miRNAs im Urin.

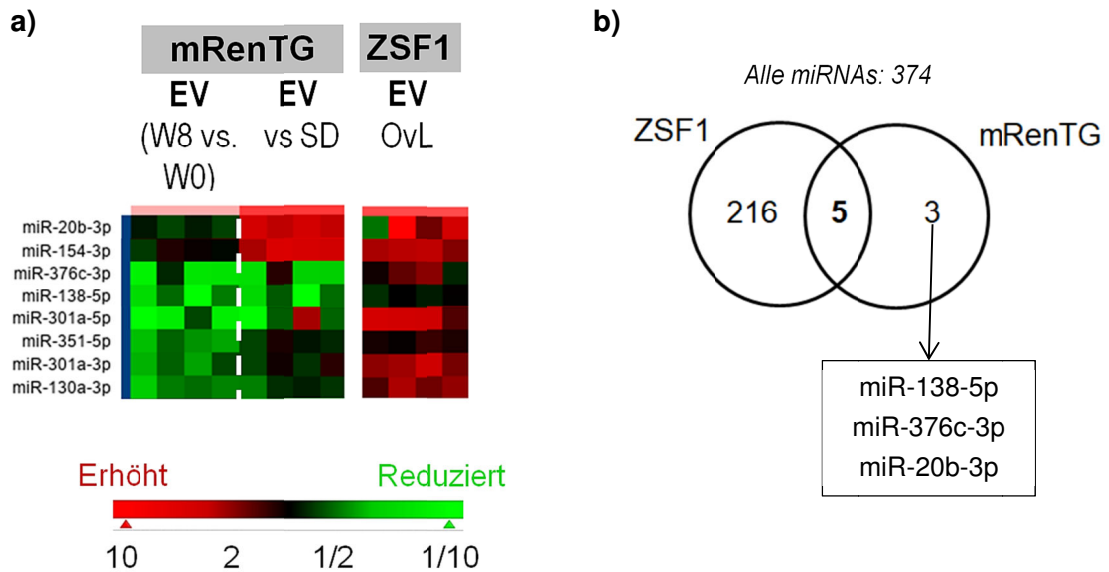
**TABELLE 21: RELATIVE MENGE AUSGEWÄHLTER MIRNAS IM NIERENGEWEBE VON ZSF1-RATTEN**

Quantifizierung von miRNAs im Nierengewebe von 14 und 26 Wochen alten, fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten mittels individueller qRT-PCR Assays von Qiagen (15 ausgewählte miRNAs, Woche 14: n= 4; Woche 26: n=8) und der Nanostring-Plattform (420 miRNAs; Woche 14: n=5; Woche 26: n=9). qRT-PCR Ergebnisse wurden auf U6 normalisiert, Nanostring Ergebnisse auf den Mittelwert von B2m, Gapdh, Rlp19 und Actb. Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur schlanken Kontrolle. Es sind relative Mengen einschließlich Standardabweichung fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur gleichaltrigen Kontrolle gezeigt. Statistische Signifikanz ist als  $*p \leq 0,05$  dargestellt. miR: microRNA. n.d.: nicht detektiert.

miRNA	ZSF1 fettleibig vs. schlank			
	qRT-PCR		Nanostring	
	Woche 14	Woche 26	Woche 14	Woche 26
<b>miR-21-5p</b>	1,29 ± 0,20	<b>1,88 ± 0,31*</b>	1,61 ± 0,64	0,77 ± 0,37
<b>miR-34a-5p</b>	4,37 ± 3,60	<b>2,22 ± 0,72*</b>	2,64 ± 1,30	2,09 ± 1,12
<b>miR-192-5p</b>	<b>0,62 ± 0,64*</b>	<b>0,64 ± 0,11*</b>	0,85 ± 0,42	<b>0,25 ± 0,17*</b>
<b>miR-29c-3p</b>	1,36 ± 0,58	<b>0,63 ± 0,11*</b>	0,95 ± 0,32	<b>0,36 ± 0,15*</b>
<b>miR-184</b>	n.d.	n.d.	<b>16,46 ± 2,83*</b>	<b>27,96 ± 14,61*</b>
<b>miR-132</b>	n.d.	n.d.	<b>2,48 ± 0,40*</b>	<b>2,94 ± 0,61*</b>

#### 4.3.2 MicroRNA-Profil in Urin von mRenTG-Ratten

Im vorangegangenen Kapitel wurde das miRNA-Profil im Urin von ZSF1-Ratten analysiert, welche MetS-ähnlicher Komorbiditäten einschließlich Bluthochdruck, Veränderungen des Metabolismus (z.B. Diabetes) und CKD entwickeln (siehe Kapitel 1.2.1 der Einleitung). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob vergleichbare Veränderungen von miRNAs im Urin auch in einem Tiermodell mit ausschließlich Bluthochdruck-induzierter CKD beobachtet werden können. Für den Vergleich wurde das miRNA-Profil in Urin-EVs von mRenTG-Ratten mit paralleler NO-Inhibition durch L-NAME untersucht, für die in vorherigen Kapiteln 4.1.2 und 4.1.3 bereits ein ausgeprägter Nierenschaden gezeigt wurde. Hierzu wurden analog zu den ZSF1-Ratten EVs aus dem Urin von mRenTG-Ratten vor und nach 8-wöchiger L-NAME-Behandlung sowie aus SD-Kontrolltieren angereichert, die miRNAs isoliert und 374 miRNAs parallel durch qRT-PCR quantifiziert.



**ABBILDUNG 21: VERÄNDERTE MI RNAs IN URIN-EVs VON mREN TG-RATTEN NACH L-NAME BEHANDLUNG UND VERGLEICH ZUM MI RNAs-PROFIL IN ZSF1-RATTEN**

a) Hierarchisches Clustering signifikant veränderter miRNAs in Urin-EVs von mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME verglichen zum Behandlungsstart und verglichen zur SD-Kontrolle (n=4). Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur Kontrolle. Es sind die Verhältnisse der erkrankten Tiere relativ zum Mittelwert der entsprechenden Kontrollen in Form einer Heatmap gezeigt. Relative miRNA-Mengen wurden mit relativen Mengen in Urin-EVs von fettleibigen ZSF1-Ratten relativ zur schlanken Kontrolle verglichen. Statistische Analyse der miRNAs in ZSF1-Ratten erfolgte ebenfalls mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur schlanken Kontrolle. b) Venn-Diagramm. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta\Delta C_t$  Methode ausgewertet. W: Woche. EV: Extrazelluläre Vesikel. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. SD: Sprague-Dawley-Ratten. OvL: Fettleibig versus schlanke Kontrolle. FDR: engl. *False discovery rate*. miR: microRNA.

Insgesamt waren insgesamt acht miRNAs in Urin-EVs der L-NAME behandelten mRenTG-Ratten über den Behandlungszeitraum von acht Wochen und verglichen zur SD-Kontrolle signifikant verändert (Abbildung 21a, Anhang-Tabelle 40). Sechs dieser acht miRNAs waren in mRenTG-Ratten nach Behandlung mit L-NAME verglichen zum Behandlungsstart reduziert (z.B. miR-138-5p, miR-130a-3p), während zwei miRNAs (miR-20b-3p, miR-154-3p) erhöhte Level in behandelten mRenTG-Ratten verglichen zur SD-Kontrolle zeigten. Fünf der acht miRNAs waren ebenfalls in Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle signifikant verändert, jedoch zumeist erhöht (Abbildungen 21a und 21b). Drei miRNAs (miR-138-5p, miR-376c-3p, und miR-20b-3p) waren ausschließlich im mRenTG-Modell signifikant dereguliert (Abbildung 21b).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass im mRenTG-Rattenmodell nach zusätzlicher Behandlung mit dem L-NAME deutlich weniger miRNAs in Urin-EVs verglichen zur Kontrolle verändert sind als im ZSF1-Rattenmodell, obwohl der

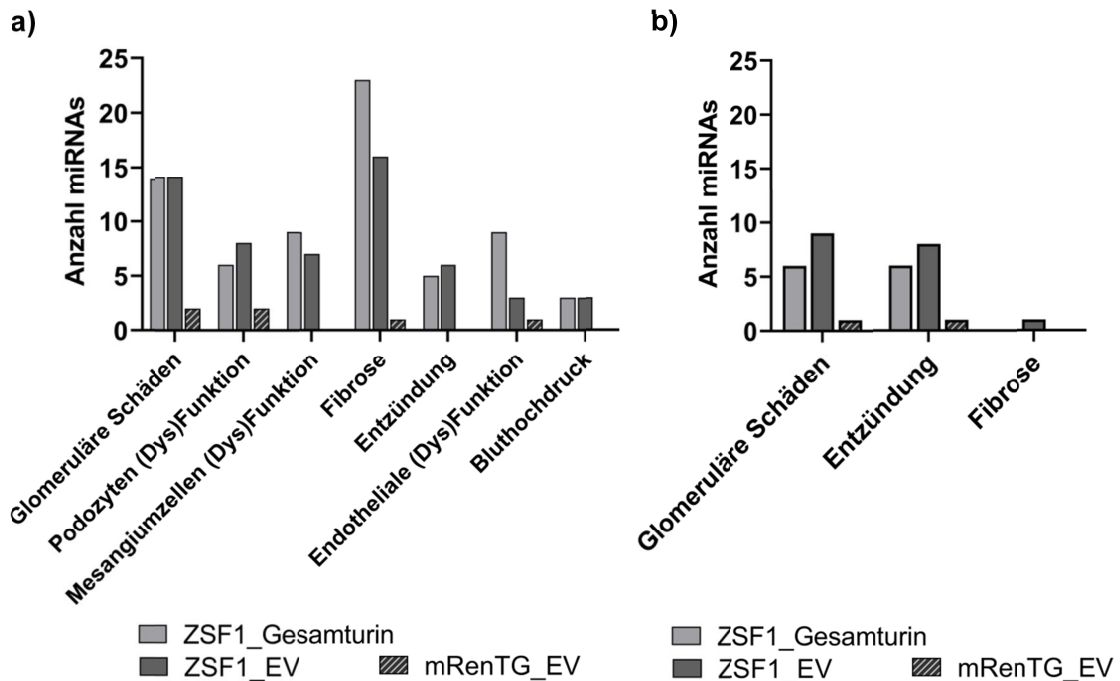
Nierenschaden in beiden Tiermodellen stark ausgeprägt war. Die im mRenTG-Rattenmodell identifizierten acht miRNA in Urin-EVs könnten potenziell mit primären oder sekundären Bluthochdruck-assoziierten Schäden assoziiert sein. MiR-154-3p könnte hierbei sowohl im mRenTG- als auch im ZSF1-Tiermodell als potenzieller Biomarker für CKD untersucht und charakterisiert werden.

#### **4.3.3 Annotation signifikant veränderter miRNAs im Urin von ZSF- und mRenTG-Ratten**

Ein Vorteil von miRNAs als Biomarker für Nierenschäden ist deren Potential, mechanistische Einblicke in die der CKD zugrundeliegenden Pathomechanismen wie Fibrose oder glomeruläre Schäden geben zu können (siehe Kapitel 1.4.2 der Einleitung). Daher wurden die im ZSF1- und mRenTG-Tiermodell veränderten miRNAs einer funktionellen Annotation unterzogen. Für das ZSF1-Modell wurden dabei 111 miRNAs in die Analyse eingeschlossen, welche neben Veränderungen in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur Kontrolle zusätzlich Trends oder signifikante Veränderungen in fettleibigen ZSF1-Ratten zwischen Woche 14 und 26 zeigten. Für das mRenTG-Modell wurden die acht miRNAs verwendet, welche verglichen zur Kontrolle und im Laufe der achtwöchigen Behandlung signifikant verändert waren.

Die manuelle Annotation zeigte, dass von den 111 und acht veränderten miRNAs im Urin von ZSF1- und mRenTG-Ratten über 90 % zuvor als exprimiert in der Niere beschrieben wurden. Nach literaturbasierter Annotation waren die meisten dieser miRNAs zusätzlich assoziiert mit CKD-relevanten pathophysiologischen Prozessen wie glomerulären Schäden (einschließlich Schädigung von Mesangiumzellen und Podozyten), renaler Inflammation, Nierenfibrose, Fehlfunktion von Endothelzellen und Bluthochdruck (Abbildung 22a). EV-Anreicherung in ZSF1-Ratten erhöhte dabei die Anzahl der detektierten und signifikant veränderten miRNAs im Urin, welche mit den genannten CKD pathophysiologischen Prozessen wie renaler Fibrose und glomeruläre Schäden assoziiert wurden. Eine Übersicht über ausgewählte miRNAs und deren Assoziation mit verschiedenen pathologischen Prozessen ist zusätzlich in Tabelle 22 dargestellt. Die Ergebnisse der manuellen Analyse wurden durch eine IPA-basierte Analyse unterstützt (Abbildung 22b), welche ebenfalls eine Assoziation von miRNAs in ZSF1- und mRenTG-Ratten mit glomerulären Schäden, Entzündungsprozessen und Fibrose zeigte. Generell wurden durch IPA weniger miRNAs bestimmten Pathomechanismen der CKD zugeordnet. Dies liegt unter anderem daran, dass miRNAs mit einer identischen Sequenz von sieben Nukleotiden in der mRNA-

bindenden Region vor der Analyse zusammengefasst und damit nicht differenziert betrachtet werden. Zudem verwendet IPA eine kuratierte Datenbank, welche nicht alle verfügbaren Publikationen umfasst.



**ABBILDUNG 22: FUNKTIONELLE ANNOTATION VERÄNDERTER miRNAs IM URIN VON ZSF1- UND mRENTG-RATTEN**

a) Literaturbasierte, manuelle Annotation (Pubmed, Google Scholar) und b) IPA-basierte Annotation von signifikant veränderten miRNAs in Urin-EVs und Gesamturin fettleibiger ZSF1-Ratten (111 miRNAs) und Urin-EVs von mRenTG-Ratten behandelt mit L-NAME (20 mg/L) für 8 Wochen (acht miRNAs) relativ zu den entsprechenden Kontrollen (n=4). Ergebnisse sind als die Anzahl an miRNAs assoziiert mit dem angegebenen biologischen oder toxikologischen Prozess oder Funktion gezeigt. MiRNAs wurden mittels miRCURY LNA qRT-PCR Panels (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta\Delta Ct$  Methode normalisiert. Ausgewählte miRNAs mit einem multiplen T-Test  $p \leq 0,05$  einschließlich Korrektur durch FDR und einem Effekt  $\geq 2$ -fach wurden für die Annotation verwendet. EV: Extrazelluläre Vesikel. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. FDR: engl. *False discovery rate*.

Neben der IPA-Software wurde zusätzlich die Webapplikation TAM 2.0 zur Annotation der miRNAs, und damit zur Bestätigung der manuellen Literaturrecherche und IPA-Analyse verwendet. Bei dieser Applikation handelt es sich um eine literaturbasierte miRNA-Clusteranalyse, welche ebenfalls miRNAs mit verschiedenen Pathomechanismen, Erkrankungen und Transkriptionsfaktoren assoziiert. Aufgrund der geringen Anzahl deregulierter miRNAs im Urin von mRenTG-Ratten wurde diese Analyse nur mit den Daten der ZSF1-Tiere durchgeführt. In dieser Analyse waren von den 111 deregulierten miRNAs in ZSF1-Ratten 46 miRNAs mit Apoptose, 42 miRNAs mit Entzündungsprozessen, 39 miRNAs mit Zellzyklus, und 26 miRNAs mit EMT assoziiert (Tabelle 22, Anhang-Tabelle 41). Zusätzlich waren bereits 45, 17, 14 und 12

miRNAs zuvor im Zusammenhang mit Typ-2-Diabetes, CKD und DN beschrieben worden. 14 und 13 miRNAs wurden mit Bluthochdruck und Übergewicht assoziiert. Eine potenzielle Assoziation von 10 miRNAs mit Egr1 und von 9 miRNAs mit TGF- $\beta$ 1 wurde ebenfalls identifiziert.

**TABELLE 22: ASSOZIATION AUSGEWÄHLTER miRNAs IM URIN VON ZSF1- UND mRENTG-RATTEN MIT ZENTRALEN PATHOLOGISCHEN PROZESSEN DER CKD**

Literaturbasierte, manuelle Annotation (Pubmed, Google Scholar) und Software-basierte Annotation (IPA, TAM 2.0) ausgewählter, signifikant veränderten miRNAs in Urin-EVs und Gesamturin fettleibiger ZSF1-Ratten und Urin-EVs von mRenTG-Ratten behandelt mit L-NAME (20 mg/L) für 8 Wochen relativ zu den entsprechenden Kontrollen (n=4). Ergebnisse sind als exemplarische miRNAs assoziiert mit dem angegebenen biologischen oder toxikologischen Prozess oder Funktion gezeigt. MiRNAs wurden mittels miRCURY LNA qRT-PCR Panels (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta$ Ct Methode analysiert. Ausgewählte miRNAs mit einem multiplen T-Test  $p \leq 0,05$  einschließlich Korrektur durch FDR und einem Effekt  $\geq 2$ -fach wurden für die Annotation verwendet. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. FDR: engl. *False discovery rate*. G: Gesamturin; EV: Extrazelluläre Vesikel, eNOS: endotheliale NO-Synthase. miR: microRNA. DN: Diabetische Nephropathie.

Pathologischer Prozess	Assoziierte miRNAs (Literatur, IPA, TAM 2.0)
Fibrose	mRenTG (EV): miR-130a-3p ZSF1 (G): miR-93-5p, Let-7a/b/c/d/i-5p, miR-27a-3p, miR-155-5p, miR-24-3p, miR-19a-3p, miR-130b-3p, miR-34c-5p, miR-342-3p, miR-98-5p, miR-20a-5p, miR-19b-3p ZSF1 (EV): miR-145-5p, miR-146a/b-5p, miR-342-3p, miR-216a-5p, miR-124-3p, miR-215, miR-10b-5p, miR-188-5p, miR-29b-2-5p, miR-34c-5p, miR-384-5p, miR-325-3p, miR-19b-3p
Glomeruläre Schäden	ZSF1 (G): miR-24-3p
Podozyten(dys)funktion	mRenTG (EV): miR-130a-3p, miR-301a-3p ZSF1 (G): miR-15b-5p, miR-27a-3p, miR-34c-5p ZSF1 (EV): miR-145-5p, miR-15b-5p, miR-124-3p, miR-34c-5p
Schädigung von Mesangiumzellen	ZSF1 (G): miR-322-5p, miR-15b-5p ZSF1 (EV): miR-342-3p, miR-15b-5p, miR-216a-5p
Inflammation	ZSF1 (G): miR-155-5p, miR-125a/b-5p, miR-19b-3p ZSF1 (EV): miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-188-5p, miR-125b-2-3p, miR-325-3p, miR-19b-3p
Schädigung proximaler Tubuluszellen	ZSF1 (G): miR-24-3p, miR-20a-5p, let-7d-5p ZSF1 (EV): miR-146a-5p, miR-19b-3p
Endotheliale (Dys)Funktion, z.B. Aktivität der eNOS	mRenTG (EV): miR-138-5p ZSF1 (G): miR-17-5p, miR-497a-5p, miR-503-5p, miR-181c-5p, miR-20a-5p, let-7f-5p ZSF1 (EV): miR-487b-3p
Zellzyklus	ZSF1 (G): miR-24-3p, miR-19b-3p, miR-20a-5p, miR-503-5p, miR-92a-3p, miR-98-5p, miR-125b-1-3p, miR-16-5p, miR-19b-3p, miR-16-5p, miR-125b-2-3p, miR-205-5p, miR-19a-3p, miR-155-5p ZSF1 (EV): miR-19b-3p, miR-124-3p, miR-125b-1-3p, miR-19b-3p, miR-145-5p, miR-125b-2-3p, miR-122
DN, MetS	ZSF1 (G): miR-218-5p, miR-130b-3p, miR-125b-1-3p, miR-125b-2-3p ZSF1 (EV): miR-124-3p, miR-130b-3p, miR-125b-1-3p, miR-



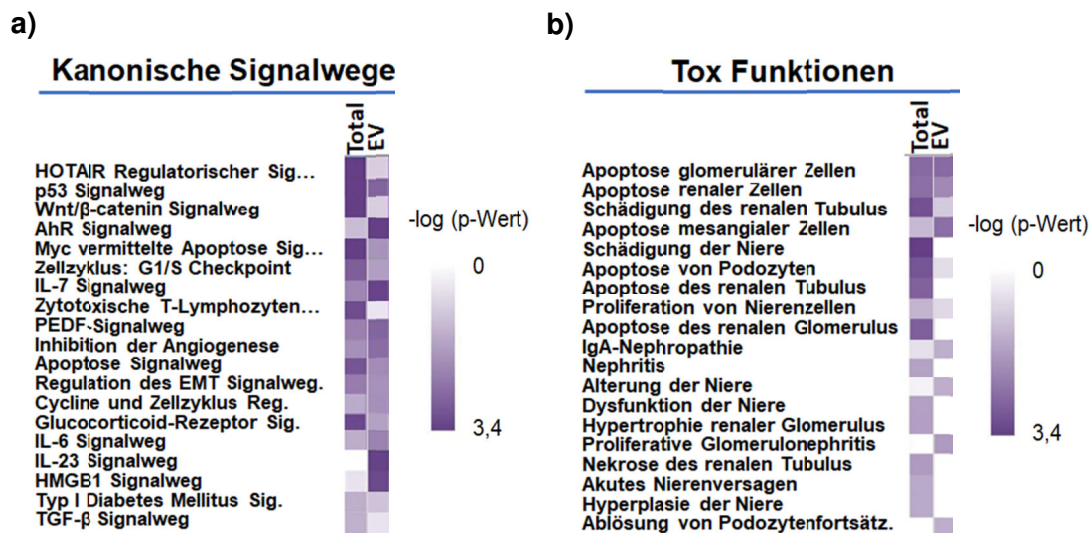
---

	125b-2-3p, miR-146a-5p
Bluthochdruck	<u>ZSF1 (G)</u> : miR-98-5p, miR-24-3p, miR-155-5p <u>ZSF1 (EV)</u> : miR-133a-3p, miR-146a-5p, miR-122-5p, miR-133a-3p

---

Eine Hauptfunktion von miRNAs ist die Regulation der Genexpression durch gezielten Abbau von mRNAs, welche zu den miRNAs komplementäre Nukleotid-Sequenzen besitzen (siehe Kapitel 1.4.1 der Einleitung). Um zu untersuchen, ob die im Urin von ZSF1-Ratten veränderten miRNAs nach Aufnahme in renale Zellen mRNAs mit Einfluss auf den Verlauf von Nierenschäden regulieren könnten, wurden potenzielle Ziel-mRNAs mittels der IPA Software vorhergesagt. MRenTG-Ratten wurden aufgrund der geringen Anzahl signifikanter miRNAs ebenfalls von dieser Analyse ausgeschlossen. Potenzielle Ziel-mRNA mit einem Konfidenzlevel von „experimentell beobachtet“ oder „Hoch“ und einer Relevanz für die Spezies Ratte wurden analog zur Analyse von mRNA-Genexpressionsdaten mit IPA analysiert. Damit wurden mit den mRNAs assoziierte kanonische Signalwege, sowie Bio und Tox-Funktionen identifiziert. Die Vorhersagen wurden hierbei speziell für Nierengewebe und renale Zelllinien durchgeführt.

Die Analyse potenzieller Ziel-mRNAs ergab, dass miRNAs im Urin von ZSF1-Ratten potenziell mRNAs regulieren könnten, welche eine Rolle in verschiedenen Signalwegen des Immunsystems (z.B. Il-7 Signalweg, zytotoxische T-Lymphozyten Signalweg), von Fibrose-assoziierten Funktionen (z.B. TGF- $\beta$  Signalweg, Regulation des EMT Signalweges), der Apoptose und der Zellzyklusregulation spielen (Abbildung 23a). In Übereinstimmung hierzu wurden potenziell beeinflusste, toxikologisch relevante Prozesse wie Apoptose glomerulärer und tubulärer Zellen, Entzündung der Niere und Proliferation vorhergesagt (Abbildung 23b). EV-Anreicherung der miRNAs erhöhte dabei die Assoziation mit Schädigungsprozessen des Glomerulus und bestimmten Signalwegen, wie zum Beispiel dem AhR- oder verschiedener Interleukin-Signalwegen.



**ABBILDUNG 23: FUNKTIONELLE ANNOTATION POTENZIELLER ZIEL-MRNAs VON miRNAs IM URIN VON ZSF1-RATTEN**

Analyse von Ziel-mRNA veränderter miRNAs im Urin von 14, 22 und 26 Wochen alten ZSF1-Ratten (n=4) mittels IPA Software. Gezeigt sind a) Vorhersagen der kanonischen Signalwege und b) Assoziationen mit Tox-Funktionen der vorhergesagten Target-Gene in Form von Heatmaps basierend auf  $-\log(p\text{-Wert})$ . MiRNAs wurden mittels miRCURY LNA qRT-PCR Panels (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta\text{Ct}$  Methode analysiert. Ausgewählte miRNAs mit einem multiplen T-Test  $p \leq 0,05$  einschließlich Korrektur mittels FDR und einem Effekt  $\geq 2$ -fach wurden für die Vorhersage verwendet. mRNAs mit einem Konfidenzlevel von "experimentell beobachtet" oder "hoch" in der Spezies Ratte wurden einer Core-Analyse in IPA unterzogen. Die Vorhersage kanonischer Signalwege und Funktionen wurden auf renale Zelltypen beschränkt. EV: Extrazelluläre Vesikel. Total: Gesamturin. Tox: Toxikologische. FDR: engl. *False discovery rate*.

Die theoretisch vorhergesagten Ziel-mRNAs wurden anschließend mit der realen Genexpression im ZSF1-Rattenmodell verglichen. Hierbei wurde nach miRNA-mRNA Beziehungen gesucht, bei denen mRNA und miRNA gegensätzliche Effekte in der Expression zeigen. In Urin-EVs korrelierten 56 hauptsächlich erhöhte miRNAs hierbei mit 152 hauptsächlich reduzierten mRNAs im Nierengewebe von ZSF1-Ratten (Anhang-Tabelle 42). Unter anderem wurde für acht und 13 veränderte miRNAs im Gesamturin beziehungsweise Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle vorhergesagt, dass sie Stanniocalcin-1 (Stc1) mRNA binden und abbauen können (Tabelle 23). Stc1-mRNA war im Nierengewebe von 14, 22 und 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Tieren verglichen zur entsprechenden schlanken Kontrolle signifikant reduziert. Im Gesamturin zeigten 33 miRNAs gegensätzliche Trends zu 111 mRNAs in der Niere von fettleibigen ZSF1-Tieren verglichen zur schlanken Kontrolle, wobei unter anderem die mRNAs von Igf1 und Cxcl12 potenzielle Zielstrukturen für miRNA-vermittelte Degradation darstellen könnten (Tabelle 23, Anhang-Tabelle 42).

**TABELLE 23: INVERSE KORRELATION AUSGEWÄHLTER miRNAs IM URIN MIT BEKANNTEN ZIEL-mRNAs IM NIERENGeweBE VON ZSF1-RATTEN**

Korrelationsanalyse ausgewählter, möglicher Ziel-mRNA im Nierengewebe und signifikant veränderten miRNAs im Urin fettleibiger, 14 bis 26 Wochen alter Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle (n=4) mittels IPA Software. MiRNAs wurden mittels miRCURY LNA qRT-PCR Panels (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta Ct$  Methode analysiert. Ausgewählte miRNAs mit einem multiplen T-Test  $p \leq 0,05$  einschließlich Korrektur mittels FDR und einem Effekt  $\geq 2$ -fach wurden für diese Analyse verwendet. mRNA Mengen wurden mit Hilfe von Affymetrix Mikroarrays bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweifachen ANOVA ermittelt ( $BH-q \leq 0,05$ ). EV: Extrazelluläre Vesikel. FDR: engl. *False discovery rate*. miR: microRNA. ↓: Reduziert in fettleibig verglichen zur schlanken Kontrolle. OvL: Fettleibig versus schlanke Kontrolle.

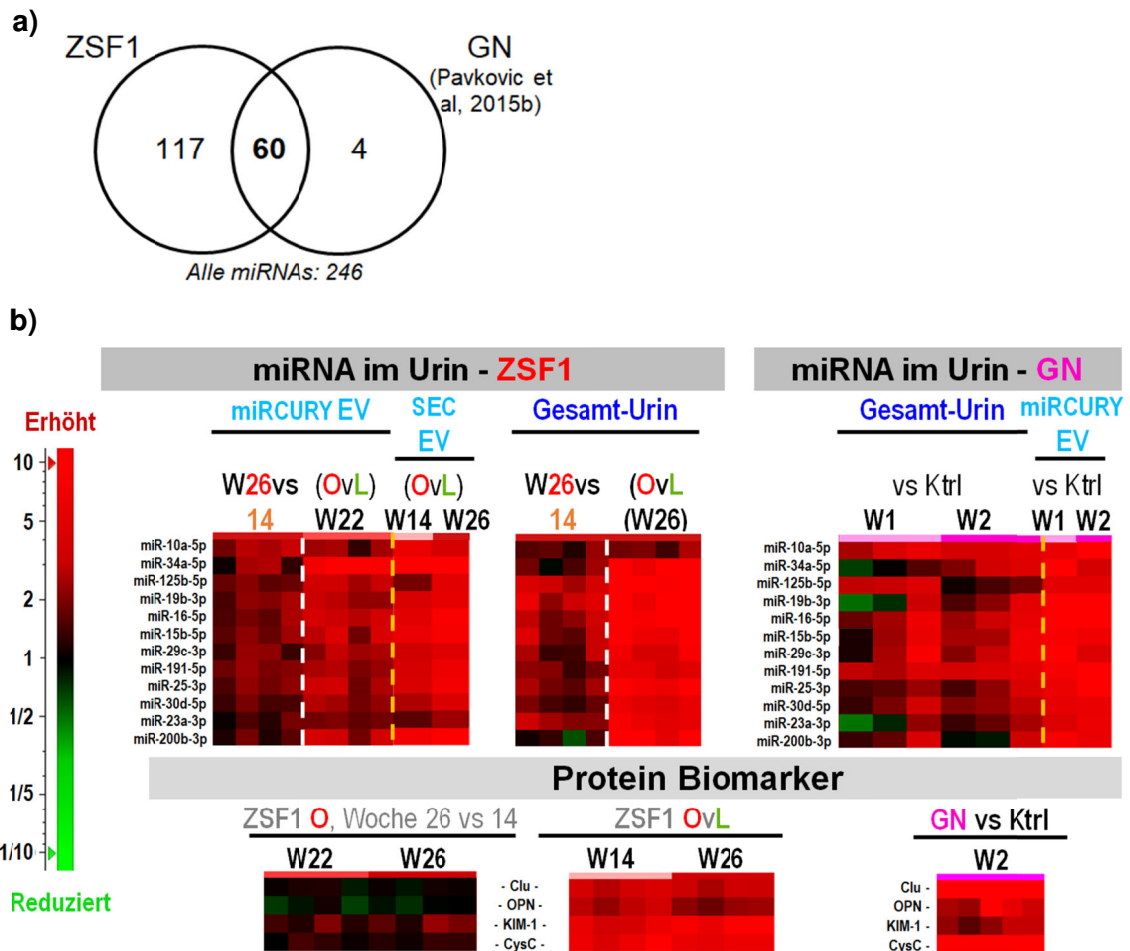
mRNA in ZSF1 Nierengewebe	Assoziierte miRNA (EV, OvL)	Assoziierte miRNA (Gesamturin, OvL)
Stc1 (↓)	miR-145-5p (↑), miR-133a-3p (↑), miR-146a-5p (↑), miR-208a-3p (↑), miR-208a-5p (↑), miR-323a-5p (↑), miR-34b-5p (↑), miR-34c-5p (↑), miR-376b-3p (↑), miR-484 (↑), miR-488-5p (↑), miR-504 (↑), miR-9-3p (↑)	miR-130b-3p (↑), miR-190b-5p (↑), miR-106b-5p (↑), miR-351-5p (↑), miR-34b-5p (↑), miR-34c-5p (↑), miR-376b-3p (↑), miR-672-5p (↑)
Bcl6 (↓)	miR-124-3p (↑), miR-185-3p (↑), miR-10a-5p (↑), miR-34c-5p (↑), miR-632 (↑), miR-291a-3p (↑)	miR-34c-5p (↑)
Igf1 (↓)	miR-15b-5p (↑), miR-19b-3p (↑)	miR-130b-3p (↑), miR-497-5p (↑), miR-19a-3p (↑), miR-27a-3p (↑)
Cxcl12 (↓)	miR-219a-2-3p (↑), miR-874-3p (↑)	miR-130b-3p (↑), miR-154-3p (↑), miR-23a-3p (↑), miR-31-5p (↑), miR-362-3p (↑), miR-672-5p (↑), miR-450a-5p (↑)

Zusammenfassend zeigten sowohl die manuelle als auch die softwarebasierte Annotation eine potenzielle Assoziation der veränderten miRNAs im Urin von ZSF1- und mRenTG-Tiere mit zentralen Pathomechanismen der CKD wie renaler Fibrose sowie glomerulärer und tubulärer Schädigung. Für mehrere miRNAs im Urin diabetischer ZSF1-Tiere wurde eine zusätzliche Assoziation mit Typ-2-Diabetes und DN identifiziert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass zahlreiche miRNAs im Urin bereits im Rahmen verschiedener Nierenerkrankungen beschrieben wurden und potenziell wichtige mRNAs mit Einfluss auf die CKD regulieren könnten. Veränderte miRNAs in ZSF1-Ratten könnten somit eine aktive Rolle in Physiologie oder Pathogenese der Niere spielen und als potenzielle, funktionelle Biomarker für CKD dienen. Zusätzliche EV-Anreicherung im Urin von ZSF1-Ratten kann dabei die Anzahl detektierter miRNAs mit potenzieller Relevanz in glomerulärer Zellschäden und renaler Entzündung erhöhen.

#### 4.3.4 Vergleich der microRNA-Profile im Urin von ZSF1-Ratten mit einem Rattenmodell für Glomerulonephritis

In den vorangegangenen Kapiteln wurde das miRNA-Profil im Urin des ZSF1-Tiermodell für MetS und DN-ähnliche CKD und im mRenTG-Tiermodell für ausgeprägten Bluthochdruck analysiert und verglichen. Während durch die histopathologische Analyse in beiden Tiermodellen glomeruläre Schäden in der Niere identifiziert wurden (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.2), hatte auch die Annotation der miRNAs eine potenzielle Assoziation von veränderten miRNAs im Urin mit glomerulären Schäden gezeigt (siehe Kapitel 4.3.3). Um die mögliche Verbindung von miRNAs im Urin mit glomerulärer Schädigung zu bekräftigen, wurden nun zusätzlich die Ergebnisse der ZSF1-Ratten mit publizierten Daten zu miRNAs im Gesamturin eines Rattenmodells für Glomerulonephritis mit sekundärer tubulärer Schädigung verglichen (Pavkovic et al. 2015b) (GEO Datenbank: GSE64265). Die experimentellen Parameter der Studie von Pavkovic et al (2015b) wurden bereits in Kapitel 4.2.3.3 zusammengefasst. Der Urin wurde hier an Tag acht und 14 nach NTS-Behandlung über 24h in metabolischen Käfigen gesammelt. Die Lagerung des Urins und die anschließende Isolation von miRNA aus Gesamturin erfolgte analog zu den ZSF1-Ratten (Pavkovic et al. 2015b). Für den Vergleich EV-assoziiierter miRNAs wurden zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit Urinproben von Pavkovic et al (2015b) aufgetaut und EVs mit dem *miRCURY Exosome Isolation Kit* isoliert. Es wird explizit darauf hingewiesen, dass die Proben fünf Jahre bei -80°C bis zur erneuten Verwendung im Rahmen dieser Arbeit gelagert wurden. Anschließend erfolgte die gezielte Quantifizierung 12 ausgewählter miRNAs in Urin-EVs von Ratten mit NTS-induzierter Glomerulonephritis. Ähnlich zu den Experimenten in ZSF1-Tieren soll hierdurch der Mehrwert einer EV-Anreicherung für die Detektion von potenziellen miRNA-Biomarkern für glomeruläre Schäden untersucht werden. Eine Übersicht über die hier relevanten Studien ist in Anhang-Abbildung 34 dargestellt.

Von den 246 miRNAs, welche in beiden Studien gemessen wurden, waren 60 miRNAs im Gesamturin beider Tiermodellen signifikant verändert (Abbildung 24a). 117 miRNAs wurden nur im Urin von ZSF1-Ratten identifiziert, während vier miRNAs spezifisch für Ratten mit Glomerulonephritis waren. Die meisten miRNAs waren dabei in Tieren mit Nierenschäden verglichen zur entsprechenden Kontrolle erhöht. Eine Auswahl von 12 miRNAs in ZSF1-Ratten und Ratten nach NTS-Behandlung ist in Abbildung 24b gezeigt.



**ABBILDUNG 24: VERGLEICH VON miRNAs IM URIN EINES RATTENMODELLS FÜR GLOMERULONEPHRITIS UND VON ZSF1-RATTEN.**

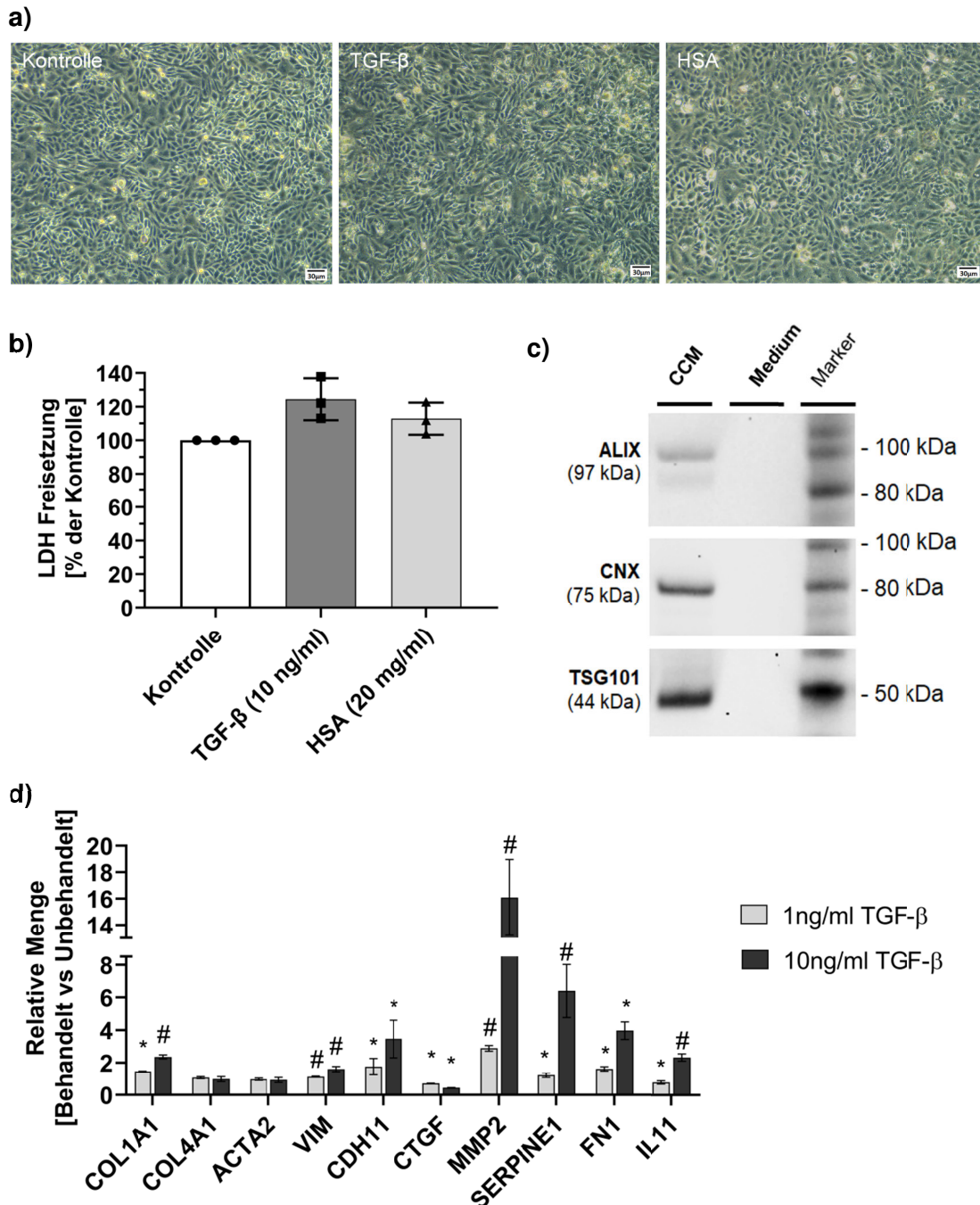
a) Vergleich signifikant veränderter miRNAs im Gesamturin von fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten (n=4) mit publizierten miRNA-Daten aus Urin von NTS-induzierter Glomerulonephritis in WKY-Ratten (NTS: n=5; Kontrollen n=3). b) Quantifizierung ausgewählter miRNAs im Gesamturin und Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten (EV-Isolation: miRCURY Kit, Qiagen; qEV-Säulen, Izon) und im Rattenmodells für NTS-induzierte Glomerulonephritis (EV-Isolation: miRCURY Kit, Qiagen) einschließlich jeweiligen Kontrollen. Zusätzlich wurden vier Proteinbiomarker im Gesamturin der zwei Tiermodelle quantifiziert. Es sind die Verhältnisse der erkrankten Tiere relativ zum Mittelwert der entsprechenden Kontrollen in Form einer Heatmap gezeigt. Alle Ergebnisse wurden nach der modifizierten  $\Delta\text{Ct}$ -Methode einschließlich Kreatinin-Normalisierung ausgewertet. Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur schlanken Kontrolle. W: Woche. Ktrl: Kontrolle. GN: Glomerulonephritis. EV: Extrazelluläre Vesikel. OvL: Fettleibig versus schlanke Kontrolle. O: Fettleibig.

Alle 12 getesteten miRNAs waren sowohl in Urin-EVs der fettleibigen ZSF1-Ratten nach miRCURY Kit- oder qEV-basierten Anreicherung als auch in Urin-EVs NTS-behandelter Ratten verglichen zu den entsprechenden Kontrollen erhöht. Für die neun miRNAs miR-34a-5p, miR-19b-3p, miR-16-5p, miR-15b-5p, miR-29c-3p, miR-191-5p, miR-25-3p, miR-30d-5p und miR-23a-3p war der Effekt dabei deutlich stärker in Urin-EVs ausgeprägt als im Gesamturin von NTS-behandelten Ratten (Anhang-Tabelle 38).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass mehrere miRNAs im Urin von ZSF1-Ratten ebenfalls im Urin eines Rattenmodells für Glomerulonephritis erhöht waren. Diese miRNAs könnten somit potenziell mit Pathomechanismen assoziiert sein, welche in beiden Tiermodellen auftreten, wie zum Beispiel mit primären glomerulären Schäden und sekundären tubulären Schäden und renaler Fibrose. EV-Anreicherung erhöhte dabei die Stärke des beobachteten Effekts und könnte somit von Vorteil für die Biomarkerdetektion sein.

#### **4.3.5 MicroRNA-Profil in einem *in vitro*-Modell für renale Fibrose und Albuminurie**

Ein zentraler Prozess in der Entstehung und Progression von CKI und CKD ist die Fibrose, wobei durch Ersatz von funktionellem Gewebe in der Niere durch EZM die Nierenfunktion beeinträchtigt wird (Lovisa et al. 2015). Dies kann unter anderem zu erhöhter Konzentration von Proteinen wie Albumin im Urin führen (Bökenkamp 2020). Diese Albuminurie wird zum einen als Biomarker für eingeschränkte Nierenfunktion verwendet, zum anderen können tubuläre Schäden durch erhöhte Albuminkonzentrationen zusätzlich verstärkt werden. In Kapitel 4.1.3 wurde bereits parallel zu einer ausgeprägten Nierenschädigung eine erhöhte Proteinmenge im Urin von ZSF1- und mRenTG-Ratten beschrieben, während in beiden Tiermodellen eine ausgeprägte Nierenfibrose auf Genexpressionsebene gezeigt werden konnte (Kapitel 4.2.3). Zudem unterstützte die literaturbasierte funktionelle Annotation von miRNAs in ZSF1- und mRenTG-Ratten bereits eine mögliche Verbindung zwischen miRNAs im Urin und renaler Fibrose (Kapitel 4.3.3). In diesem Teil der Arbeit soll nun untersucht werden, ob die Veränderungen der miRNAs im Urin der beiden Tiermodelle potenziell mit Vorgängen der renalen Fibrose in proximalen Tubulus assoziiert sein könnten und als mögliche Biomarker für diesen Pathomechanismen geeignet sein könnten. Hierzu wurde ein *in vitro*-Modell für renale Fibrose und Albuminurie verwendet, bei dem hRPTECs für 48 Stunden mit TGF- $\beta$ 1, einem zentralen Mediator der renalen Fibrose, oder HSA behandelt werden (Anhang-Abbildung 37). Von beiden Behandlungen wurde berichtet, dass sie Bedingungen einer CKD *in vitro* simulieren (Hills et al. 2009; Wu et al. 2014; Yamamoto et al. 1993). Beide Behandlungen hatten dabei keinen signifikanten negativen Einfluss auf die Zellmorphologie oder Zellviabilität (Abbildungen 25a und 25b).



#### ABBILDUNG 25: ZELLMORPHOLOGIE, ZELLVIABILITÄT UND INTRAZELLULÄRE MRNA NACH BEHANDLUNG RENALER PROXIMALER TUBULUSZELLEN MIT TGF- $\beta$ 1 UND HSA

a) Zellmorphologie und b) Zellviabilität von hRPTECs nach Behandlung mit TGF- $\beta$  (10 ng/ml) oder HSA (20 mg/ml) für 48 Stunden (n=3). Zellviabilität wurde mit Hilfe des LDH-Assays bestimmt. Statistische Analyse erfolgte mittels T-Test ( $p \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 1,5$  verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Es sind relative LDH-Mengen im Zellkulturmedium behandelter Zellen relativ zur Kontrolle gezeigt. Maßstab: 30  $\mu$ m. c) Western Blot-Analyse der exosomal Proteine TSG101 und Alix, und des mikrovesikulären Proteins Calnexin in EV-angereichertem Zellkulturmedium nach Kultivierung von hRPTECs für 48h oder ohne Zellkontakt (n=3, gepoolt). EVs wurden aus 80 ml Zellkulturmedium mit Hilfe der *miRCURY Exosome Isolation Kits* (Qiagen) isoliert. d) Genexpression von bekannten TGF- $\beta$  Zielgenen in hRPTECs nach Behandlung mit TGF- $\beta$  (1 und 10 ng/ml) für 48 Stunden (n=3). mRNA wurde mittels TaqMan-basierter qRT-PCR quantifiziert und nach der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode einschließlich Normalisierung auf GAPDH als Referenzgen ausgewertet. Statistische Analyse erfolgte mit einem zweifachen ANOVA einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ )



kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  in behandelten verglichen zu unbehandelten Zellen. Statistische Signifikanz ist als ANOVA \*  $p \leq 0,05$  oder #  $p \leq 0,001$  gezeigt. Dargestellt sind mRNA Mengen in behandelten Zellen relativ zur unbehandelten Kontrolle einschließlich Standardabweichung. hRPTEC: humane renale proximale Tubulusepithelzellen. TGF- $\beta$ : engl. *Tumor growth factor beta*. HSA: Humanes Serum-albumin. EV: Extrazelluläre Vesikel. CCM: engl. *Cell-conditioned medium* (zell-konditioniertes Medium). LDH: Laktat-Dehydrogenase. CNX: Calnexin. FDR: engl. *False discovery rate*.

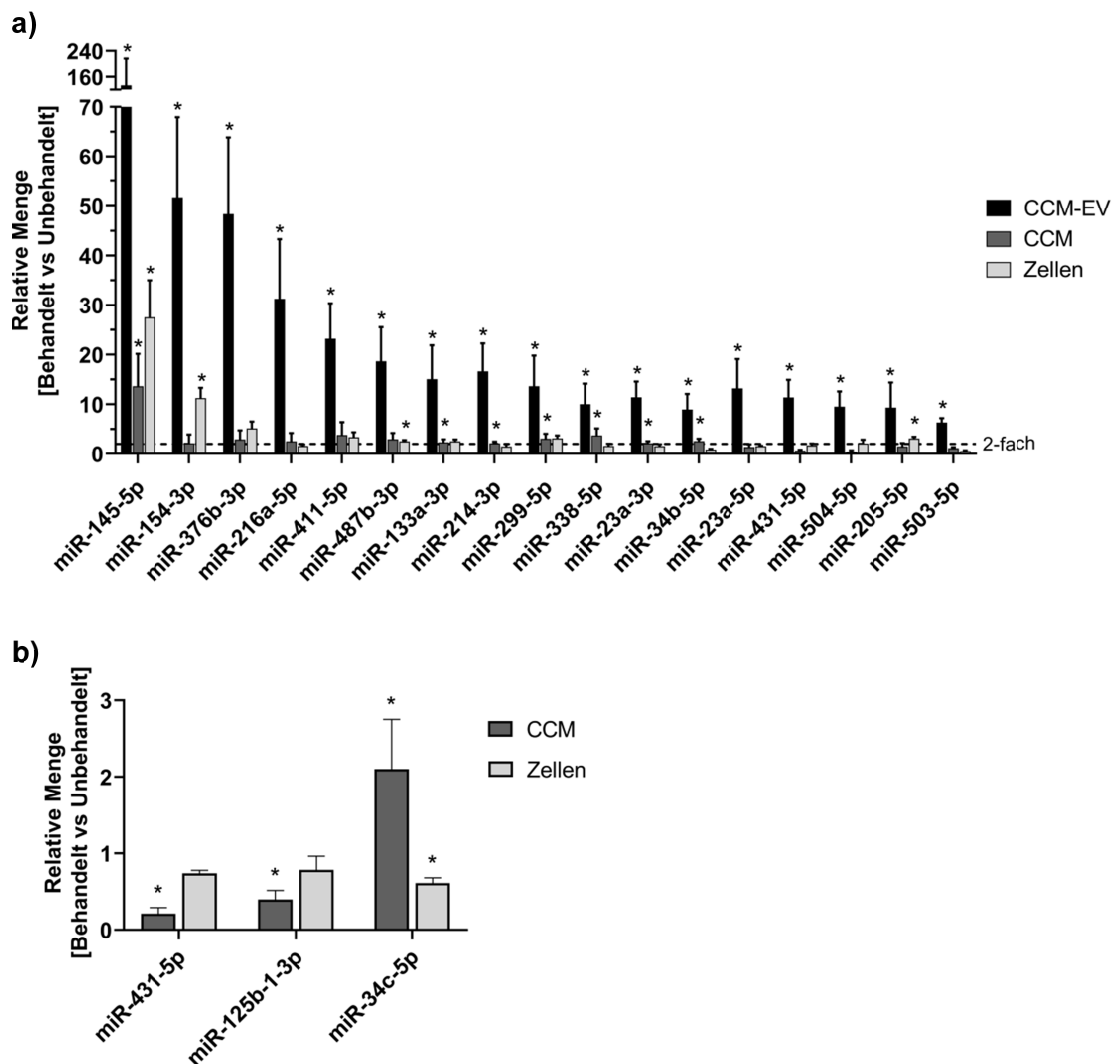
Um die Wirksamkeit der Behandlung zu überprüfen, wurden in der Literatur beschriebene Gene, deren Genexpression durch TGF- $\beta$  oder HSA reguliert werden können, nach Behandlung der hRPTECs auf mRNA-Ebene quantifiziert. Inkubation mit TGF- $\beta$  für 48 Stunden induzierte die Expression sieben der zehn beschriebenen Gene, zum Beispiel von Kollagen 1a1 (COL1A1) und Vimentin (VIM) (Abbildung 25d). Kein Behandlungseffekt konnte für COL4A1 oder ACTA2 detektiert werden. Insgesamt bestätigte das Ergebnis die Effektivität der Behandlung. HSA erhöhte die Genexpression von COL1A1 verglichen zur unbehandelten Kontrolle, während die Genexpression von Interleukin 6 (IL6) reduziert war (Anhang-Abbildung 37). Keine signifikanten Effekte konnten für TGF- $\beta$ , TIMP1, CHAC1, Interleukin-2 oder FN gezeigt werden. Basierend auf den ausgewählten Genen war die HSA-Behandlung demnach weniger effektiv auf Genexpressionsebene verglichen zu TGF- $\beta$ .

Analog zu den *in vivo*-Untersuchungen sollte auch hier analysiert werden, ob das miRNA-Profil im Medium nach TGF- $\beta$  oder HSA-Behandlung von proximalen Tubuluszellen verändert ist und ob EV-Anreicherung die Detektion zusätzlicher miRNAs ermöglicht. Daher wurde zunächst durch eine Western Blot-Analyse gezeigt, dass aus dem Zellkulturmedium der behandelten Zellen erfolgreich EVs angereichert werden konnten und dass das verwendete Medium frei von mit dieser Methode messbaren EV-Kontaminationen war (Abbildung 25c). Vergleichbar zu den *in vivo*-Analysen (Kapitel 4.3.1.1) wurden hierbei ebenso sowohl die exosomalen Proteine ALIX und TSG101 als auch das mikrovesikuläre Protein Calnexin angereichert. Die Isolation von EVs nach HSA-Behandlung war technisch nicht durchführbar. Die Gründe sind ungeklärt, könnten aber eventuell mit der erhöhten Viskosität des Mediums nach Zugabe von 20 mg/ml HSA zusammenhängen, welche potenziell mit dem Präzipitationsprozess der gewählten EV-Isolationsmethode interferiert.

Für die parallele Quantifizierung von miRNAs in Zellkulturmedium und hRPTECs nach Behandlung mit TGF- $\beta$  oder HSA wurden 93 miRNAs gewählt. Diese 93 miRNAs waren zum einem im Urin des ZSF1- oder mRenTG-Rattenmodell signifikant verändert (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2). Zum anderen wurden miRNAs selektiert, für welche in der Literatur eine potenzielle Verbindung mit Nierenschädigung beschrieben wurde. Eine zusätzliche miRNA-Clusteranalyse mittels der TAM 2.0-Webapplikation bestätigte eine



Assoziation von 87 dieser 93 miRNAs mit zentralen Pathomechanismen renaler Schädigung einschließlich EMT, dem TGF- $\beta$  Signalweg und mit Typ-2-Diabetes (Anhang-Tabelle 41). Die Behandlung mit TGF- $\beta$  führte zu einem signifikanten Anstieg aller 93 gemessener miRNAs in Zellkulturmedium nach EV-Anreicherung (Anhang-Abbildung 37, Anhang-Tabelle 47). Eine Auswahl von miRNAs ist in Abbildung 26a dargestellt.



**ABBILDUNG 26: QUANTIFIZIERUNG VON INTRAZELLULÄRER mRNA UND miRNA IM KONDITIONIERTEM MEDIUM UND ZELLEN NACH BEHANDLUNG RENALER PROXIMALER TUBULUSZELLEN MIT TGF- $\beta$ 1**

a) Auswahl signifikant deregulierter miRNAs im Zellkulturmedium und Zellen nach Behandlung von hRPTECs mit HSA (20 mg/ml) für 48h (n=3). b) Auswahl signifikant deregulierter miRNAs im gesamten Zellkulturmedium, Medium-EVs und hRPTECs nach Behandlung von hRPTECs mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) für 48h (n=3). MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Panels (Qiagen) quantifiziert. EVs wurden aus 80 ml Zellkulturmedium mit Hilfe des *miRCURY Exosome Isolation Kits* (Qiagen) isoliert. MiRNAs im Zellkulturmedium und CCM-EVs wurden nach der modifizierten  $\Delta$ Ct-Methode ohne Normalisierung auf UCrea ausgewertet. Intrazelluläre miRNAs wurden nach der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode einschließlich Normalisierung auf das Referenzgen U6 ausgewertet. Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test ( $p \leq 0,05$ ) einschließlich Korrektur mittels der FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 1,5$

(Zellen) oder  $\geq 2,0$  (CCM, EV) verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanz ist als \*  $p \leq 0,05$  oder #  $p \leq 0,001$  gezeigt. Es sind relative Mengen einschließlich Standardabweichung von behandelten verglichen mit unbehandelten Zellen dargestellt. hRPTEC: humane renale proximale Tubulusepithelzellen. TGF- $\beta$ : engl. *Tumor growth factor beta*. HSA: Humanes Serum-albumin. EV: Extrazelluläre Vesikel. CCM: engl. *Cell-conditioned medium* (Zellen-konditioniertes Medium). FDR: engl. *False discovery rate*.

Im gesamten Zellkulturmedium waren zum Vergleich lediglich sieben miRNAs (z.B. miR-145-5p, miR-23a-3p) in HSA-behandelten Zellen verglichen zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht. Für alle sieben miRNAs war der Anstieg im gesamten Medium dabei weniger stark ausgeprägt verglichen zu den EV-angereicherten Proben. Für vier miRNAs wurde auf dem intrazellulären Level eine signifikante Veränderung nach Behandlung verglichen zur unbehandelten Kontrolle identifiziert (z.B. miR-145-5p, miR-154-3p) (Abbildung 26a, Anhang-Tabelle 47). miR-145-5p war die einzige miRNA, welche sowohl im gesamten Medium und in Medium nach EV-Anreicherung sowie intrazellulär signifikant erhöht war. Zudem zeigte miR-145-5p den stärksten Anstieg nach Behandlung mit TGF-  $\beta$  in allen drei untersuchten Probengruppen. Fünf miRNAs waren signifikant sowohl im gesamten Zellkulturmedium als auch nach EV-Anreicherung des Mediums signifikant erhöht, zeigten allerdings keine intrazellulär veränderten Mengen in hRPTECs. Diese miRNAs waren unter anderem miR-23a-3p und miR-34b-5p (Anhang-Tabelle 47). Behandlung von hRPTEC mit HSA beeinflusste die relative Menge von lediglich 12 miRNAs im gesamten Zellkulturmedium und elf miRNAs auf intrazellulärer Ebene von hRPTECs verglichen zur unbehandelten Kontrolle (Anhang-Abbildung 37, Anhang-Tabelle 47). Drei ausgewählte miRNAs sind in Abbildung 26b dargestellt. Lediglich miR-34c-5p war sowohl im Medium als auch intrazellulär signifikant verändert.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass HSA-Exposition in dem hier verwendeten *in vitro*-Modell die miRNA-Freisetzung von proximalen Tubuluszellen in das Zellkulturmedium kaum beeinflusst. Im Gegensatz induzierte TGF- $\beta$ , ein zentraler Regulator der renalen Fibrose, die Freisetzung mehrerer miRNAs durch proximale Tubuluszellen in das Zellkulturmedium deutlich. Dieser Effekt war besonders nach EV-Anreicherung des Zellkulturmediums exponierter hRPTECs ausgeprägt. Dies unterstützt die Möglichkeit, dass Veränderungen der miRNAs im Urin von Tiermodellen mit CKD *in vivo* den zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozess der renalen Fibrose reflektieren.

## 5. Diskussion

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Identifikation von miRNAs im Urin als potenzielle Biomarker für CKD, welche möglicherweise Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse der Niere erlauben. Dafür wurden in zwei verschiedenen Tiermodellen für CKD miRNA-Profile in Urin-EVs oder im Gesamturin bestimmt sowie deren potenzielle Assoziation mit pathophysiologischen Prozessen in der Niere untersucht. Hierzu wurde die renale Genexpression *in vivo* und Veränderung der miRNA-Freisetzung in einem *in vitro*-Modell für renale Fibrose und Albuminurie analysiert. Durch einen Vergleich der renalen Genexpression in verschiedenen Tiermodellen der Krankheits- oder Toxin-assoziierten CKD wurden hierbei unter anderem tiermodellsspezifische von unspezifischen Pathomechanismen getrennt. Da zudem bekannt ist, dass adverse Veränderungen der Leber- und Herzfunktion die Funktion und Pathogenese der Niere beeinflussen können (Mantovani et al. 2016; Zhao et al. 2020a), wurden zusätzlich die Genexpression dieser Organe bestimmt. Dadurch sollte ein gesamtheitliches Bild der Pathogenese in den verwendeten Tiermodellen gewonnen werden. Ein Vergleich der miRNA- sowie Genexpressionsprofile mit publizierten Daten zu Patienten mit Bluthochdruck, MetS oder DN sollte zudem die Vergleichbarkeit der Tiermodelle zur humanen Situation evaluiert werden. Im Folgenden werden zunächst die Veränderungen in Herz, Leber und Niere der Tiermodelle diskutiert, während anschließend der Fokus auf miRNA im Urin als Biomarker für renale Schäden gelegt wird.

Die histopathologische Untersuchung des Herzens zeigte eine perivaskuläre, myokardiale Fibrose in mRenTG-Ratten nach zusätzlicher eNOS-Inhibition durch achtwöchige Behandlung mit L-NAME. Diese Fibrose spiegelte sich in einer veränderten Expression von Genen mit Assoziation zu fibrotischen Prozessen einschließlich Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalweges und Inhibition des Apelin-Signalweges (Apln) in L-NAME behandelten mRenTG-Ratten wieder. Apelin ist ein Faktor aus dem Fettgewebe, welcher sowohl die TGF- $\beta$  vermittelte Aktivierung von Herz-Fibroblasten und somit die kardialen Fibrose inhibiert, als auch der TGF- $\beta$  vermittelten Hypertrophie von Kardiomyozyten entgegenwirken kann (Pchejetski et al. 2012). In Übereinstimmung hiermit wurden weitere Veränderungen der Genexpression identifiziert, welche potenziell mit einer Hypertrophie von Kardiomyozyten in Zusammenhang stehen. Zu diesen gehört unter anderem eine erhöhte Aktivität des Proteins Myotrophin (Mtpn) (Mukherjee et al. 1993). Zudem wurde im mRenTG-Rattenmodell eine erhöhte Aktivität von Angiotensinogen auf Basis der deregulierten Gene prognostiziert. Die Aktivierung des RAAS einschließlich der vermehrten

Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin durch das Protein Renin steht unter anderem in Zusammenhang mit erhöhtem Blutdruck, welcher zur kardialen Fibrose, Veränderung der Kontraktilität und Hypertrophie des Herzens führen kann (Jia et al. 2018). In Übereinstimmung mit der RAAS-Aktivierung wurde in L-NAME behandelten mRenTG-Ratten eine Veränderung der Herzfunktion auf Genexpressionsebene festgestellt. Unter anderem wurde eine Aktivierung von Endothelin-1 (Edn1) abgeleitet. Dieses Protein ist essentiell für die normale Kontraktion des Herzens sowie involviert in der Regulation des Bluthochdruckes (Hathaway et al. 2015; Vignon-Zellweger et al. 2012). Zudem wurde eine überwiegende Inhibition von Genen identifiziert, welche mit dem Aktionspotential des Herzens assoziiert sind. Hierzu gehörten unter anderem Gene verschiedener Kalium-, Calcium- und Natriumtransportern. Veränderungen des Aktionspotentials in Kardiomyozyten können zu einer Veränderung der Herzkontraktion bis hin zum sogenannten Längen-QT-Syndrom und zur Tachykardie führen (Tamargo et al. 2004). Obwohl die Veränderung der Genexpression insgesamt moderat ausfiel, können zusammenfassend eine myokardiale Fibrose, Hypertrophie, Aktivierung des RAAS sowie eine Veränderung der Herzfunktion in L-NAME behandelten mRenTG-Ratten abgeleitet werden. Sowohl die Veränderung der EZM durch TGF- $\beta$  als auch die Hypertrophie können entweder eine Anpassungsreaktion des Herzens im Hinblick auf den erhöhten Bluthochdruck sein, oder auf eine exzessive Induktion dieser Mechanismen hindeuten, welche über die Zeit zur Funktionseinschränkung des Herzens führen kann (Tham et al. 2015). Insgesamt stimmen diese Beobachtungen größtenteils mit Publikationen überein, welche bereits zuvor eine myokardiale Fibrose in unbehandelten und L-NAME behandelten mRenTG-Ratten berichtet (Connelly et al. 2007; Kolkhof et al. 2021; Sharkovska et al. 2010). Ebenso wurde eine Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie eine Aktivierung von TGF- $\beta$ , Endothelin und des RAAS bereits in mRenTG-Ratten ohne L-NAME gezeigt (Connelly et al. 2007; Hayden et al. 2006; Zolk et al. 2002). Im Gegensatz hierzu wurde die reduzierte Aktivität von Apelin bislang zwar in anderen Tiermodellen für Bluthochdruck berichtet (Iwanaga et al. 2006), allerdings noch nicht in mRenTG-Ratten gezeigt. Ebenso wurde unter anderem eine Aktivierung von Myotrophin im mRenTG-Modell bislang noch nicht beschrieben. Die Rolle dieser spezifischen Proteine, Signalwege und Prozesse im mRenTG-Modell sollten in weiteren Studien gezielt adressiert werden, um die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf funktioneller Ebene zu bestätigen. Dies würde nicht nur zu einer weiteren Charakterisierung dieses Tiermodells und zur Erforschung der molekularen Mechanismen der Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion, sondern auch zum weiteren Verständnis von Prozessen im Herzen von Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer

Ejektionsfraktion und Herzversagen beitragen, welche ebenfalls durch eine Aktivierung des RAAS, Myotrophin, Endothelin-1 und TGF- $\beta$ , sowie durch Hypertrophie gekennzeichnet sind (Bielecka-Dabrowa et al. 2016; Binder et al. 2021; Chowdhury et al. 2019; Jia et al. 2018; Sil et al. 1993). Alle zuvor diskutierten Veränderungen waren spezifisch für L-NAME behandelte mRenTG-Ratten, während kaum Effekte in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit Captopril relativ zu gesunden SD-Ratten erkennbar waren. Dies bestätigt auf Genexpressionsebene den bislang nur auf funktioneller und histopathologischer Ebene gezeigten Wert von Captopril-behandelten, hypertensiven Ratten mit diastolischer Herzinsuffizienz als gesunde Kontrolle in diesem Tiermodell (Follmann et al. 2017; Hirth-Dietrich et al. 1994; Salah et al. 2018).

Die Genexpressionsprofile der mRenTG-Ratten wurden im nächsten Schritt mit der kardialen Genexpression in 22 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten verglichen. Zwar wurden im ZSF1-Modell geringfügige Veränderungen der kardialen Expression identifiziert, allerdings konnten deutlich weniger pathophysiologischen Mechanismen identifiziert werden. In 59 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten wurde das erste Mal eine reduzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors GATA4 aus der Genexpression abgeleitet. GATA4 ist ein Regulator der Hypertrophie von Kardiomyozyten und eine reduzierte Aktivität begünstigt eine hypertrophe Reaktion sowie erhöhte Fibrose und Apoptose im Herzen (Bisping et al. 2006). Zudem wurde eine nicht signifikante reduzierte Expression von Genen in 22 und 26 Wochen alten Ratten identifiziert, welche mit der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und KLF15, einem Regulator des mitochondrialen Fettsäuremetabolismus (Prosdocimo et al. 2015), assoziiert ist. Diese Effekte waren vergleichbar zu publizierten Daten in 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten (Brandt et al. 2019) und bestätigen eine tendenzielle Reduktion der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in diesen Tieren. Die hier erhobenen Daten komplementieren dabei die Publikation von Brand et al (2019) indem sie das erste Mal zeigen, dass diese Effekte in 46 bis 59 Wochen alte Tiere auf Genexpressionsebene nicht beobachtet werden können. Dies deutet auf unterschiedliche Assoziation der kardialen Pathogenese mit der mitochondriale Funktion in jungen und alten ZSF1-Ratten hin. Zusätzlich wurden sowohl in 22 als auch 59 Wochen alten Tieren einzelne Gene mit einer Verbindung zum Immunsystem, der Apoptose, dem Apelin-Signalweg, dem Aktionspotential der Kardiomyozyten, dem kardialen Lipidmetabolismus, der oxidativer Stressantwort und der EZM identifiziert. Die Art der Genexpressionsänderungen ähneln den Ergebnissen einer früheren Publikation, in der im linken Ventrikel 20 Wochen alter ZSF1-Ratten ebenso eine reduzierte Expression von Komponenten des Apelin-Signalweges, und eine veränderte

Genexpression mit Assoziation zu Fibrose, Hypertrophie und dem Lipidmetabolismus identifiziert wurden (Stolina et al. 2020). Zudem wurden zuvor eine myokardiale Fibrose, minimale myokardiale Steatose, moderate Myokarditis und mikrovaskuläre Entzündung, Hypertrophie sowie eine diastolische Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion in elf bis 32 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten gezeigt (Bilan et al. 2011; Bode et al. 2021; Brandt et al. 2019; Davila et al. 2019; Franssen et al. 2016; Hamdani et al. 2013; Miranda-Silva et al. 2020; Nguyen et al. 2020; Stolina et al. 2020; Tofovic et al. 2000; van Dijk et al. 2016). Die hier erhobenen Daten weisen allerdings darauf hin, dass sich diese pathologischen Veränderungen auf mikroskopischer und funktionaler Ebene weniger deutlich in der kardialen Genexpression widerspiegeln als im als im mRenTG-Modell. Für einzelne Gene wurde diese fehlende Korrelation bereits in der Literatur beschrieben. Zum Beispiel wurde eine fehlende Korrelation der kardialen Expression von Genen für Tgf- $\beta$ , Fibronectin-1 und Kollagene mit einer histopathologisch identifizierter Fibrose in ZSF1-Ratten schon beschrieben (Brandt et al. 2019). Die genauen molekularbiologischen Ursachen, die mögliche Rolle von GATA4 in der kardialen Pathogenese und die Frage, auf welcher Ebene diese funktionellen und histopathologischen Befunde reguliert werden, müssen in weiteren Studien adressiert werden. Zuvor publizierte Effekte auf den oxidativen Metabolismus in Mitochondrien sowie eine Inhibition von PPAR- $\alpha$  und Aktivierung von Myc (Summer et al. 2020) konnten in dieser Arbeit hingegen nicht bestätigt werden. Die Gründe für diese Diskrepanz müssen ebenfalls in weiteren Studien gezielt adressiert werden.

In der Summe wurden hier das erste Mal moderate beziehungsweise geringfügige Veränderungen der kardialen Genexpression in L-NAME behandelten mRenTG-Ratten und 22 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten gezeigt. Im mRenTG-Rattenmodell sind die veränderten Gene mit Fibrose, Hypertrophie der Kardiomyozyten und Veränderungen der Herzmuskelkontraktilität assoziiert. Da diese Prozesse ebenfalls bei humaner Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion beobachtet werden können, validiert dies mRenTG-Ratten auf Genexpressionsebene erneut als Tiermodell für diese Pathogenese in Menschen. Vergleichbare Effekte konnten im ZSF1-Rattenmodell nur für einzelne Gene identifiziert werden, weshalb dieses Tiermodell die kardiale Pathogenese auf Genexpressionsebene eventuell weniger umfänglich abbildet. Dieser Vergleich macht zudem deutlich, dass trotz des mehrfach publizierten Bluthochdruckes und der Entwicklung einer diastolischen Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion in beiden Tiermodellen (Bilan et al. 2011; Kovács et al. 2016; Tofovic et al. 2000) die Genexpression im Herzen unterschiedlich beeinflusst wird. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte in der Ursache

der Herzschädigung liegen. Im mRenTG-Rattenmodell wurde durch die Renin-Überexpression gezielt das RAAS aktiviert, wodurch im Herzen pathophysiologische Mechanismen induziert werden. Im ZSF1-Rattenmodell hingegen könnte, ähnlich zu den genetisch direkt verwandten SHHF-Ratten (Heyen et al. 2002), die Herzinsuffizienz sekundär und vermehrt durch extrakardiale Mechanismen induziert werden, wodurch es zu weniger spezifischen pathophysiologischen Veränderungen des Herzens kommt. Diese Hypothese wird unterstützt von der Publikation von Brand et al (2019), in welcher unterschiedliche Effekte von Fettleibigkeit und Salz-induziertem Bluthochdruck auf die kardiale Genexpression gezeigt wurden.

In der Leber 26 Wochen alter, fettleibiger ZSF1-Ratten wurde eine moderate zentrilobuläre Vakuolisierung der Hepatozyten und allgemeine hepatozelluläre Hypertrophie festgestellt. Aus den moderaten Genexpressionsveränderungen wurde parallel eine reduzierte Aktivität des Leptinrezeptors fettleibiger Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle abgeleitet. Dies entspricht dem zugrundeliegenden Mechanismus in diesem Tiermodell, in dem eine genetisch induzierte Reduktion der Leptinrezeptor-Aktivität zu einem unkontrollierten Fressverhalten und somit Übergewicht, Typ-2-Diabetes und das MetS führt (Griffin et al. 2007; Sáinz et al. 2015). In Übereinstimmung mit der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes wurde zusätzlich eine Insulinresistenz sowie reduzierte Aktivität des Insulinsignalweges, eine Veränderung des Lipidmetabolismus einschließlich Induktion der Fettsäuresynthese und Fettsäureoxidation, sowie eine Induktion des Glukosemetabolismus einschließlich Glykolyse, Citratzyklus, Pentosephosphatweg und Glukoneogenese aus den Genexpressionsprofilen fettleibiger ZSF1-Ratten abgeleitet. Hierbei wurde unter anderem eine Aktivierung zentraler Regulatoren einschließlich Srebf1, Ghrelin und PPAR- $\gamma$  identifiziert, welche zu einer erhöhten Fettsäuresynthese und Lipidakkumulation beitragen können (Ferré und Foufelle 2010; Quiñones et al. 2020; Shimano et al. 1996). Die Veränderungen des Lipid- und Glukosemetabolismus stehen dabei eventuell in einem direkten Zusammenhang mit der Insulinresistenz (Kubota et al. 2016), sowie mit einer Veränderung des zirkadianen Rhythmus in der Leber älterer, fettleibiger ZSF1-Ratten. Denn es wurde unter anderem beschrieben, dass sowohl Ghrelin als auch Mutationen von Leptin eine Veränderung des zirkadianen Rhythmus in der Leber induzieren und dadurch sekundär den Lipidmetabolismus beeinflussen können (Motosugi et al. 2011; Quiñones et al. 2020). Weitere Veränderungen des hepatischen Metabolismus in ZSF1-Ratten umfasste eine reduzierte Expression von Genen, welche in der Biotransformation, der Gallensäure- und Retinolsynthese und im Steroidmetabolismus einschließlich Cholesterinsynthese involviert sind. Des Weiteren

wurden Veränderungen der Genexpression in fettleibigen ZSF1-Ratten identifiziert, welche auf eine überwiegend reduzierte Entgiftung bei zeitgleich erhöhter Synthese von ROS in der Leber hindeuten. So wurde unter anderem eine Reduktion verschiedener GSTs identifiziert, welche schädliche Produkte des oxidativen Stresses unschädlich machen können (Lin et al. 2016). Im Zusammenhang mit dem zuvor diskutierten erhöhten Lipidmetabolismus und Lipidakkumulation könnten diese Genexpressionsänderungen mit einer Lipidperoxidation und Lipotoxizität in fettleibigen ZSF1-Ratten im Zusammenhang stehen. Generell waren die Veränderungen der hepatischen Genexpression in 22 und 26 Wochen alten Ratten vergleichbar, während eine Reduktion der Effekte in 46 und 59 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten relativ zur schlanken Kontrolle identifiziert wurde. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte das hohe Maß der Leberschädigung sein, durch welche die dynamische und fein abgestimmte Regulation der Genexpression zunehmend eingeschränkt wird. Um diese Hypothese zu bestätigen und um zu untersuchen, ob diese Veränderungen Auswirkungen auf die Proteinsynthese und die Enzymaktivität in der Leber hat, müssten das Proteom und Metabolom der Leber untersucht und mit den hier generierten Genexpressionsdaten verglichen werden. Insgesamt entsprechen die hepatischen Genexpressionsveränderungen sowie die mikroskopische Vakuolisierung in fettleibigen, 22 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten dem Bild einer ausgeprägten Lebersteatose (Liang et al. 2014) mit parallelen Veränderungen des Lipid-, Glukose- und Steroidmetabolismus, Anzeichen oxidativen Stresses mit möglicher Verbindung zu einer Lipidperoxidation und einer moderaten Entzündung. Teilweise stehen diese Prozesse potenziell im Zusammenhang mit der ebenfalls identifizierten veränderten Wirkung von Leptin und Insulin, und einem veränderten zirkadianen Rhythmus in ZSF1-Ratten. Die Lipidvakuolen in der Leber (Bilan et al. 2011; Borges Canha et al. 2017; Hye Khan et al. 2018; Zambad et al. 2011), die Reduktion von Cholesterol- und Gallensäuremetabolismus assoziierten Genen (Castaneda et al. 2021), die Insulinresistenz, eine Veränderungen der Konzentration von Triglyzeriden und Glukose im Blut und eine erhöhte Genexpression von PPAR- $\gamma$  (Bilan et al. 2011; Borges Canha et al. 2017; Castaneda et al. 2021; Hye Khan et al. 2018; Zambad et al. 2011) wurden hierbei bereits zuvor in etwa gleichaltrigen ZSF1-Ratten gezeigt. Die hier generierten Daten bestätigen diese Publikationen auf Genexpressionsebene. Währenddessen handelt es sich bei der reduzierten Aktivität des Leptinrezeptors, der Induktion von Ghrelin und Srebf1, der Veränderungen des zirkadianen Rhythmus und der möglichen Lipidperoxidation und Lipotoxizität in der Leber um neue Beobachtungen in diesem Tiermodell. Der reduzierte Retinolmetabolismus hingegen steht im Gegensatz zu publizierten Daten, welche zuvor eine Induktion verschiedener Retinol-



metabolisierender Cytochrom-P450-Enzymen (CYPs) zeigten (Babelova et al. 2015a). Ebenfalls im Kontrast steht der reduzierte Cholesterol- und Gallensäuremetabolismus zu erhöhten Cholesterolkonzentrationen im Plasma und erhöhten Mengen an Gallensäuren im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten (Bilan et al. 2011; Castaneda et al. 2021; Hye Khan et al. 2018). Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede im Cholesterol- und Gallensäuremetabolismus wäre eine aktive Gegenregulation der Leber, durch welche aufgrund der erhöhten Konzentrationen dieser Verbindungen in der Zirkulation die weitere Produktion in der Leber reduziert werden soll. Die Ursache dieser Diskrepanzen sowie diese Hypothese müssen allerdings weiter erforscht werden. Insgesamt entsprechen diese Beobachtungen in ZSF1-Ratten den Veränderungen der Leberphysiologie in Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleber, welche ebenso durch MetS-oder Typ-2-Diabetes induziert werden kann. So wurde in diesen Patienten ebenfalls eine Vakuolisierung der Leber (Loria et al. 2003), eine Induktion von Ghrelin und Srebf1 (Quiñones et al. 2020; Walker et al. 2011), eine Veränderungen des zirkadianen Rhythmus (Shetty et al. 2018; Shi et al. 2019), und eine Lipotoxizität und Lipidperoxidation (Paschos und Paletas 2009; Svegliati-Baroni et al. 2019) beschrieben. Diese Genexpressionsanalysen bekräftigen somit den Wert des ZSF1-Modells für MetS und Type-2-Diabetes mit Relevanz für die humane Fettleber. Einige dieser pathophysiologischen Veränderungen in der Leber fettleibiger ZSF1-könnten zudem zu den Genexpressionsänderungen des Herzens (*vide supra*) und der Niere (*vide infra*) beitragen. Denn bislang wurde mehrfach ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, Inflammation, Insulinresistenz und Lipidakkumulation in der Leber und bluthochdruckinduzierten Schäden einschließlich kardialer Dysfunktion und Hypertrophie sowie der Progression von CKD identifiziert (Byrne und Targher 2020; Mantovani et al. 2016; Zhao et al. 2020a).

In der Niere fettleibiger ZSF1-Ratten zeigte die histopathologische Untersuchung eine deutliche tubuläre Dilatation und Degeneration einschließlich Proteinzyllindern, eine Glomerulopathie und eine Infiltration von Immunzellen. Parallel zu diesen mikroskopischen Veränderungen wurden ausgeprägte und mit dem Alter deutlich zunehmende Veränderungen der renalen Genexpression identifiziert. In fettleibigen ZSF1-Ratten waren hierbei verglichen zur schlanken Kontrolle unter anderem Gene mit Assoziation zu renaler Fibrose verändert, zu denen unter anderem Regulatoren der EMT, der Aktivierung von Fibroblasten, der EZM-Produktion sowie eine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges gehörten. Zudem wurde in fettleibigen Ratten eine weitreichende Induktion der Expression von Genen identifiziert, welche spezifisch für Zellen des Immunsystems sind oder die Infiltration und Aktivierung von Immunzellen induzieren.

Hierzu gehörten unter anderem eine Induktion von entzündungsfördernde Zytokinen, Interleukinen und Chemokinen. Vergleichbar zu den publizierten Daten fibrotischer Veränderungen in ZSF1-Ratten (Salatto et al. 2017; Sharif et al. 2016; Su et al. 2016; Zhou et al. 2017) wurde eine Induktion einzelner Immunsystem-assoziiertes Gene bereits in diesem Tiermodell beschrieben (Dower et al. 2017; Su et al. 2016), aber auch hier wurde das volle Ausmaß dieser Genexpressionsveränderungen bislang noch nicht gezeigt. Die glomeruläre Schädigung auf histopathologischer Ebene korrelierte mit Veränderungen der Genexpression, welche unter anderem auf eine veränderte Zusammensetzung und Synthese der glomerulären EZM einschließlich GBM und eine veränderte Physiologie und erhöhte Apoptose der Podozyten hindeuten. Eine Veränderung der Genexpression in Podozyten ab einem Alter von etwa 24 Wochen wurde bereits von Dower et al (2017) berichtet. Dies korreliert in 12 bis 57 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten mit abnehmenden Mengen podozytenspezifischer Proteine in den Glomeruli, welche verantwortlich für die Integrität der Filtrationsbarriere sind (Funk et al. 2016). Zudem wurde ebenfalls bereits eine veränderte Genexpression einzelner Komponenten der GBM wie zum Beispiel Col4a1 beschrieben (Dower et al. 2017; Salatto et al. 2017; Su et al. 2016). Somit bestätigen die hier identifizierten Genexpressionsveränderungen die publizierten glomerulären Schäden einschließlich Podozyten-Dysfunktion im ZSF1-Modell. Die veränderte Expression von Genen mit Assoziation zur oxidativen Stressantwort, zu der unter anderem eine prominente Veränderung des Glutathion-Metabolismus gehört, deutet in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Prabhakar et al. 2007; Rafikova et al. 2008) auf erhöhten oxidativen Stress im Nierengewebe fettleibiger ZSF1-Ratten hin. Oxidativer Stress ist häufig mit einer veränderten Funktion von Mitochondrien assoziiert, welche in ZSF1-Ratten ab einem Alter von 46 bis 59 Wochen zusätzlich auf Genexpressionsebene identifiziert wurde. Hierzu gehörten unter anderem eine veränderte Expression mitochondrialer Transporter und eine reduzierte oxidative Phosphorylierung. Vergleichbare Effekte wurden nicht in den anderen hier analysierten Tiermodellen für Nierenschäden identifiziert. Aufgrund der vorliegenden Daten aus den anderen Tiermodellen kann aktuell keine Schlussfolgerung gezogen werden, ob diese Effekte spezifisch für die fortgeschrittene Nierenschädigung in ZSF1-Ratten ist, oder ob vergleichbare Veränderungen in späteren Phasen der Nierenschädigung auch in den anderen Tiermodellen beobachtet werden können. Dagegen spricht, dass eine mitochondriale Dysfunktion und Reduktion der oxidativen Phosphorylierung zuvor nicht nur in diabetischen Nierenerkrankungen sondern ebenso mit Toxin-induzierten Nierenschäden assoziiert wurden (Abuelo 1990; Coughlan et al. 2016; Galvan et al. 2021; Soderland et al. 2010). Weitere Studien sind nötig, um diese Frage abschließend

zu klären. Des Weiteren wurde eine veränderte Genexpression tubulärer Transporter und Proteine der renalen Biotransformation in 14 bis 59 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten identifiziert. Die Genexpression der Transporter war dabei überwiegend reduziert, wobei unter anderem Transporter für Wasser und Natrium betroffen waren. Dies deutet auf eine ausgeprägte Veränderung oder Einschränkung der renalen Funktion hin. Eine veränderte Sekretion und Resorption von Natrium und Wasser durch reduzierte tubuläre Transporter-Aktivität könnten mit dem Phänomen der Polyurie sowie dem Bluthochdruck und der RAAS-Aktivierung in ZSF1-Ratten in Einklang stehen (Harrison-Bernard 2009; Seyahian et al. 2020), dies muss allerdings in weiteren Studien auf Proteinebene verifiziert werden. Die veränderte Genexpression einzelner Transporter wurde dabei bereits zuvor berichtet (Babelova et al. 2015b), eine veränderte Expression eines Großteils der hier identifizierten Gene wurde bislang allerdings noch nicht gezeigt. In 46 und 59 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten zeigen die Daten zudem das erste Mal eine signifikant veränderte Expression von Genen des zirkadianen Rhythmus. Obwohl eine Veränderung des zirkadianen Rhythmus bislang für ZSF1-Ratten nicht gezeigt wurden, entsprechen diese Daten einer publizierten zentralen Rolle des zirkadianen Rhythmus in der Pathogenese der DN (Olaoye et al. 2019; Pradervand et al. 2010). Zu den durch den zirkadianen Rhythmus regulierte Prozesse gehören unter anderem die glomerulären Filtration, die Transportleistung des proximalen Tubulus einschließlich Resorption von Natrium und Wasser, und der Blutdruck (Pradervand et al. 2010; Zuber et al. 2009). Die hier identifizierten Genexpressionsveränderungen können somit mit der zuvor diskutierten Hyperfiltration sowie veränderte Genexpression tubulärer Transporter und dem Bluthochdruck im ZSF1-Rattenmodell in Zusammenhang stehen.

Insgesamt fügen sich die identifizierten Veränderungen der Genexpressionsprofile und die histopathologischen Befunde in die Ergebnisse verschiedener Publikationen ein, welche die altersabhängige Entwicklung und Progression einer schweren DN einschließlich Funktionseinschränkungen der Niere, einer Glomerulosklerose mit Verdickung der GBM, Veränderung der glomerulären EZM und dem Ablösen von Podozyten, sowie einer tubulären Dilatation, Fibrose und Entzündung auf mikroskopischer und funktioneller Ebene zeigten (Bilan et al. 2011; Dower et al. 2017; Griffin et al. 2007; Homer und Dower 2018; Prabhakar et al. 2007; Salatto et al. 2017; Stolina et al. 2020; Su et al. 2016; Tofovic et al. 2002; Tofovic et al. 2000). Zusätzlich wurden auf Genexpressionsebene Veränderungen der Fettsäureoxidation, der mitochondrialen Funktion und des zirkadianen Rhythmus in älteren, fettleibigen ZSF1-Ratten gezeigt, welche mit der renalen Pathogenese der ZSF1-Ratten in Zusammenhang stehen könnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt

werden, dass aus dieser veränderten Genexpression abgeleitete kanonische Signalwege in der Niere in ZSF1-Ratten bereits ab einem Alter von 14 Wochen eine hohe Übereinstimmung mit der Genexpression in Tubuli von Patienten mit DN (Woroniecka et al. 2011) aufweisen. Zu diesen gehörten unter anderem der TGF- $\beta$ , IL-8, Extravasation von Lymphozyten, Endothelin-1 und eNOS-Signalweg und die damit verbundenen Prozesse der renalen Fibrose, Inflammation und veränderten Physiologie renaler Blutgefäße (Heiss et al. 2015; Qi et al. 2006; Raina et al. 2020). Diese Ergebnisse komplementieren hiermit die Daten von Dower et al (2017), welche bereits eine Übereinstimmung der glomerulären Expression in 34 bis 41 Wochen alten ZSF1-Ratten und Patienten mit DN zeigte. Humanrelevante tubulärer Prozesse werden demnach im ZSF1-Rattenmodell auf Genexpressionsebene bereits früher abgebildet als glomeruläre Veränderungen. Zudem bestätigte der Vergleich zu Dower et al (2017), dass die zuvor publizierten Daten zur renalen Genexpression in ZSF1-Ratten hauptsächlich die glomeruläre Expression zeigen, während die hier erhobenen Daten die Genexpression in der gesamten Niere mit Schwerpunkt auf die tubuläre Genexpression zeigen.

Die renalen Genexpressionsprofile von ZSF1-Ratten wurden mit den mRenTG-Ratten sowie mit je einem Rattenmodell für Glomerulonephritis und AA-Nephropathie verglichen. Vergleichbar zum ZSF1-Rattenmodell wurden durch histopathologische Analyse in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger eNOS-Inhibition durch L-NAME glomeruläre und tubuläre Schäden identifiziert. Diese Ergebnisse bestätigen hiermit zuvor publizierten Studien in mRenTG-Ratten mit oder ohne L-NAME Behandlung (Appelhoff et al. 2010; Kelly et al. 2007; Kolkhof et al. 2021; Sharkovska et al. 2010). Zusätzlich wurde ebenfalls in Übereinstimmung mit publizierten Daten eine ausgeprägte Vaskulopathie mit Proliferation glatter Muskelzellen (Kolkhof et al. 2021) sowie eine fehlende Infiltration von Immunzellen in mRenTG-Ratten gezeigt. Diesen histopathologischen Befunden steht ein Genexpressionsprofil gegenüber, welches mit Entzündung, Fibrose, oxidativem Stress, Nierenfunktion einschließlich Transport im Tubulus sowie glomerulären Schäden assoziiert ist. Die Veränderungen der Genexpression in mRenTG-Ratten mit CKD zeigten dabei eine große Übereinstimmung mit 26 Wochen alten fettleibigen ZSF1-Ratten, Ratten nach 12-wöchiger AA-Behandlung und dem Rattenmodell für Glomerulonephritis. Obwohl diese Effekte zuvor noch nicht auf Genexpressionsebene berichtet wurden, entsprechen diese Ergebnisse hinsichtlich einer Funktionseinschränkung des Tubulus, Fibrose, glomerulären Schädigung und oxidativen Stress zuvor publizierten Befunden in mRenTG-Ratten (Advani et al. 2007; Kolkhof et al. 2021; Linden et al. 2006; Whaley-Connell et al. 2006) und Ratten mit Glomerulonephritis (Nishimura et al. 1996;

Pavkovic et al. 2015b) und AA-Nephropathie (Cosyns 2003; Zhao et al. 2015). Lediglich im mRenTG-Rattenmodell stehen die entzündungsassoziierten Gene im Kontrast zu den histopathologischen Befunden. Eine mögliche Ursache könnte der Zeitpunkt der histopathologischen Untersuchung sein, indem nach Entwicklung der Nierenschädigung über acht Wochen über Regulation der Genexpression bereits die Produktion entzündungsfördernder Mediatoren beginnt, diese auf mikroskopischer Ebene aber noch nicht zu einer Infiltration von Immunzellen führen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde in mRenTG-Ratten ohne Captopril-Behandlung über einen Zeitraum von über 24 Wochen die Infiltration von Immunzellen berichtet (Mifsud et al. 2004). Zur Bestätigung dieses Zusammenhanges müsste in einer weiteren Studie das mRenTG-Modell über einen längeren Zeitraum nach Induktion der Nierenschädigung beobachtet werden. Vergleichbar zum ZSF1-Rattenmodell und in Übereinstimmung mit publizierten Daten konnte auch im mRenTG-Rattenmodell eine moderate Veränderung der Expression zirkadianer Gene identifiziert werden (Herichová et al. 2007). Dies war dabei spezifisch für diese beiden Tiermodelle und konnte nicht in den hier verwendeten Tiermodellen für Glomerulonephritis oder AA-induzierten Nephropathie gezeigt werden. Auch wenn eine Rolle des zirkadianen Rhythmus in verschiedenen Arten der Nierenschädigung einschließlich DN und Blutdruckinduzierter CKD bereits in Teilen beschrieben wurde (Mohandas et al. 2022), sind die möglicherweise Ätiologie-abhängigen Zusammenhänge noch unzureichend erforscht. Als mögliches CKD-Modell ohne Veränderung des zirkadianen Rhythmus könnte ein Tiermodell für AA-induzierte Nephropathie dienen.

Die größtenteils vergleichbaren Genexpressionsänderungen hinsichtlich Prozessen wie Fibrose und glomerulärer Schädigung deuten zudem auf ein vergleichbares Stadium der CKD in 26 Wochen alten ZSF1-Ratten und mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME hin, und bekräftigt die Auswahl dieser Zeitpunkte und Tiermodelle für einen Vergleich von miRNA-Profilen im Urin. Im Gegensatz zu mRenTG-Ratten mit zusätzlicher eNOS-Inhibition durch L-NAME wurden keine signifikanten Genexpressionsveränderungen in SD-Ratten nach L-NAME Behandlung identifiziert. Ebenso wurde keine Proteinurie in SD-Ratten nach Behandlung mit L-NAME beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass eine achtwöchige eNOS-Inhibition durch 30 mg/L L-NAME in den Ratten mit einer normalen Reninaktivität keine durch Proteinquantifizierung im Urin oder Genexpressionsanalysen messbaren Nierenschäden induziert. Zudem wurde vergleichbar zur Leber auch in der Niere gezeigt, dass die identifizierten Genexpressionseffekte spezifisch für L-NAME behandelte mRenTG-Ratten waren, während eine parallele Captopril-Behandlung

diesen Effekten entgegenwirkte. Dies bestätigt hiermit auch in der Niere den Wert von Captopril-behandelten mRenTG-Ratten als gesunde Kontrolle (Follmann et al. 2017; Hirth-Dietrich et al. 1994; Salah et al. 2018).

In Ratten mit NTS-induzierter Glomerulonephritis wurden im Vergleich zu den anderen Tiermodellen mehr Gene identifiziert, welche mit glomerulären Schäden assoziiert sind. Dies stimmt mit publizierten Daten überein, welche eine primäre und ausgeprägte glomeruläre Schädigung nach NTS-Behandlung zeigen, die sekundär durch Veränderungen der glomerulären Filtration zu Schäden der nachfolgenden Nephronsegmente führen (Pavkovic et al. 2015b; Togashi et al. 2013).

Die hier durchgeführte Meta-Analyse zuvor publizierter Daten zeigte ebenfalls die Induktion des Tumorsuppressors p53 sowie eine erhöhte Expression von Genen mit Assoziation zu oxidativem Stress und DNA-Schäden in AA-behandelten Ratten (Su et al. 2011). Diese Veränderungen der renalen Genexpression deuten auf eine adaptive Reaktion der Niere im Kontext einer subchronischen AA-Exposition hin, indem unter anderem durch p53-Aktivierung eine körpereigene Reaktion auf DNA-Schäden und oxidativen Stress induziert wird, um den schädigenden und unter anderem tumorinduzierenden Einfluss von AA entgegenzuwirken (Slade et al. 2009). Im Gegensatz dazu konnte in ZSF1- oder mRenTG-Ratten aus den Genexpressionsprofilen keine Induktion von p53 abgeleitet werden. Zwar wird p53 als Tumorsuppressor vermehrt im Kontext renaler Karzinogenese diskutiert (Noon et al. 2010), allerdings wurde in den letzten Jahrzehnten eine zunehmend zentrale Rolle dieses Proteins in der Regulation von metabolischen Prozessen wie der Glykolyse, oxidativer Phosphorylierung, Lipidsynthese und Insulinresistenz und somit auch in der Pathogenese der diabetischen Nierenerkrankung identifiziert (Strycharz et al. 2017; Wu und Wang 2016). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde bislang auch in anderen Studien keine Induktion von p53 in der Niere von ZSF1-Ratten beschrieben. Möglicherweise könnte somit p53 trotz der Assoziation mit DN eine untergeordnete Rolle in der renalen Pathogenese von ZSF1-Ratten spielen.

In der Summe zeigen diese Genexpressionsanalysen eine große Ähnlichkeit zugrundeliegender pathophysiologischer Prozesse wie renaler Fibrose, Entzündung oder glomeruläre Schäden in verschiedenen Tiermodellen mit subakuten bis chronischen Nierenschäden. Dies lässt auf eine vergleichbar verlaufende Progression von Nierenschäden unabhängig von der Ursache schließen. Allerdings zeigen die hier beschriebenen Analysen auch unterschiedliche Auswirkungen auf die Genexpression je nach Ursache der Nierenschädigung. So konnte aufgrund einer anhaltenden Exposition gegenüber der Schädigungsursache für AA-induzierte Nephropathie eine Induktion von Genen mit Verbindung zu p53 und DNA-Reparaturmechanismen

bestätigt werden, während eine Aktivierung von p53 im ZSF1-Rattenmodell nicht abgeleitet werden konnte. Dagegen wurden nur in ZSF1-Ratten Veränderungen der oxidativen Phosphorylierung und des zirkadianen Rhythmus, und in mRenTG-Ratten Effekte auf den zirkadianen Rhythmus identifiziert. Auch wenn sich diese Beobachtungen in das Gesamtbild der verschiedenen Arten der Nierenschädigung einfügen, sind weitere Untersuchungen notwendig, um auszuschließen, dass die hier identifizierten Unterschiede aufgrund von unterschiedlichen Stadien der CKD entstanden sind.

Parallel zu den histopathologischen Befunden und Veränderung der renalen Genexpression wurde eine deutliche Veränderung der Nierenfunktion in fettleibigen ZSF1-Ratten festgestellt. Unter anderem war die Urinausscheidung in fettleibigen ZSF1-Ratten signifikant gegenüber der schlanken Kontrolle erhöht, welche als Polyurie oder Hyperfiltration in den fettleibigen Tieren interpretiert wird. Zeitgleich stieg der Gesamtproteingehalt im Urin fettleibigen ZSF1-Ratten relativ zur schlanken Kontrolle und in fettleibigen ZSF1-Ratten mit zunehmendem Alter an. Das Ausmaß des Anstieges fällt in den Bereich einer ausgeprägten Proteinurie, welche auf eine deutliche und mit dem Alter zunehmende Nierenschädigung in fettleibigen ZSF1-Ratten hindeutet. Sowohl die erhöhte Urinexkretion als auch die Proteinurie entsprechen dabei publizierten Daten, welche vergleichbare Beobachtungen bereits in acht bis 32 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten (Bilan et al. 2011; Castaneda et al. 2021; Griffin et al. 2007; Prabhakar et al. 2007; Tofovic et al. 2000; Zhou et al. 2017) und in Patienten mit DN berichteten (Tonneijck et al. 2017; Williams 2005). Die Hyperfiltration in Ratten und Patienten mit Diabetes steht dabei im Gegensatz zu einer reduzierten glomerulären Funktion einschließlich verringerte GFR und ansteigenden glomerulären Schädigung (Caramori et al. 2003; Dower et al. 2017; Tofovic et al. 2000). Nach aktuellem Kenntnisstand könnte die Hyperfiltration durch Hyperglykämie und erhöhte Proteinzufuhr, oder durch Dysfunktion der proximalen Tubuluszellen einschließlich erhöhtem intra-renalen Blutdruck induziert sein (Bilan et al. 2011; Tonneijck et al. 2017), die genauen molekularbiologischen Prozesse in Tiermodellen und Menschen sind aktuell jedoch noch unzureichend verstanden. Da das ZSF1-Modell das Phänomen der Hyperfiltration gut abbildet und auf Genexpressionsebene die humanen Prozesse einer DN umfänglich abbildet, handelt es sich bei den ZSF1-Ratten um ein gutes präklinisches Modell, in dem die zugrundeliegenden Prozesse in Folgestudien gezielt adressiert werden sollten.

Neben diesen klassischen Parametern wurden zusätzlich vier neuere Proteinbiomarker für Nierenschäden im Urin von ZSF1-Ratten quantifiziert. Hierbei wurden erhöhte Konzentrationen der Proteine KIM-1, CYSC, CLU und OPN im Urin fettleibiger ZSF1-



Ratten relativ zur schlanken Kontrolle identifiziert. Während auf Genexpressionsebene alle vier Biomarker mit zunehmendem Alter der Ratten anstiegen, konnte nur für KIM-1 ein Anstieg der Konzentrationen im Urin mit fortschreitendem Alter beobachtet werden. Die Ergebnisse der Quantifizierung von KIM-1 entsprechen dabei zuvor publizierten Daten, welche größtenteils moderat erhöhte KIM-1 Konzentration im Urin und Nierengewebe fettleibiger, 14 bis 41 Wochen alter ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle zeigten (Castaneda et al. 2021; Dower et al. 2017; Salatto et al. 2017; Su et al. 2016; Su et al. 2018). Die Konzentrationen von KIM-1 deutet auf eine Schädigung des proximalen Tubulus in fettleibigen ZSF1-Ratten relativ zur schlanken Kontrolle und auf eine Zunahme dieser Schädigung in 14 bis 26 Wochen alten, fettleibigen Tieren hin (Han et al. 2002). Die erhöhte Genexpression des Biomarkers OPN in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle bestätigt ebenfalls zuvor publizierte Daten im ZSF1-Modell (Dower et al. 2017; Su et al. 2016). CYSC und CLU wurden ebenfalls bereits als erhöht im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten berichtet (Castaneda et al. 2021; Su et al. 2016). Vergleichbar zu den Ergebnissen dieser Arbeit war der altersabhängige Anstieg von CLU und CYSC im Urin hierbei weniger stark ausgeprägt als KIM-1 (Su et al. 2016). Sowohl OPN als auch CLU sind unspezifische Biomarker für Nierenschäden (Hudkins et al. 1999; Lorenzen et al. 2008; Lyle et al. 2012; Tarrant 2017). OPN und CLU zeigen somit einen nicht spezifizierten Nierenschaden in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle an, können aber die Progression der Nierenschädigung, welche durch die Proteinurie und KIM-1 impliziert wird, im Urin von fettleibigen ZSF1-Ratten nicht abbilden. Im Gegensatz zu den anderen Proteinbiomarkern wird CYSC als Alternative zu Kreatinin zur Abschätzung der GFR verwendet, wobei reduzierte CYSC-Konzentrationen im Urin und erhöhte Konzentrationen im Blut auf eine reduzierte GFR schließen lassen (Ferguson et al. 2015). Die unabhängig von der Normalisierung auf Kreatinin erhöhten CYSC-Konzentrationen im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten stehen allerdings im Gegensatz zu der publizierten reduzierten GFR in diesem Tiermodell (Prabhakar et al. 2007; Tofovic et al. 2000; Zhou et al. 2017). Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass eine stark ausgeprägte Proteinurie und dadurch erzeugte tubuläre Dysfunktion, wie sie hier für ZSF1-Ratten gezeigt wurde, die CYSC-Konzentrationen im Urin erhöhen können. Denn unter basalen Bedingungen wird CYSC im proximalen Tubulus aus dem Urin in den Körper zurücktransportiert (Conti et al. 2006). Im Rahmen einer starken Proteinurie kann die Rückresorption von CYSC allerdings durch die erhöhte Proteinkonzentration im Urin und die dadurch entstehende Konkurrenz um die renalen Transporter reduziert werden (Kang et al. 2020; Thielemans et al. 1994). Die erhöhten CYSC-Konzentrationen im Urin der ZSF1-Ratten könnten demnach weniger



mit der GFR, sondern vielmehr mit einer tubulären Dysfunktion assoziiert sein. Dieser Zusammenhang wurde bislang allerdings nur für Patienten mit Diabetes gezeigt (Hassan et al. 2021) und muss für ZSF1-Ratten als Modell für MetS und DN in Folgestudien bestätigt werden. Bislang wurden die hier diskutierten Proteinbiomarker nur für die Verwendung in Patienten für Phase 1 von klinischen Studien qualifiziert (FDA 2018), allerdings existieren mehrere Untersuchungen, welche den Mehrwert dieser Proteinbiomarker auch in Patienten im Allgemeinen adressiert haben. Diese Studien zeigen, dass KIM-1, OPN, CYSC und CLU im Urin das Vorliegen einer DN in Menschen anzeigen können (Al-Malki 2014; Hassan et al. 2021; Kapoula et al. 2020; Khan et al. 2019; Kim et al. 2017), allerdings vergleichbar zum ZSF1-Modell die Progression der CKD nicht zuverlässig abbilden (Khan et al. 2019; Yamaguchi et al. 2004).

In der Summe bestätigen die klassischen Marker und neueren Proteinbiomarker für Funktion und Schädigung der Niere die bereits publizierte und in den vorherigen Abschnitten diskutierte, ausgeprägte Nierenschädigung in 14 bis 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle. Diese gehen dabei mit Veränderungen und Einschränkung der Nierenfunktion einschließlich Hyperfiltration, Proteinurie und Schädigung des proximalen Tubulus einher. Im ZSF1-Modell wurde die Progression der CKD hierbei am besten durch den Gesamtproteingehalt, welcher als unspezifischer Marker für Nierenschäden dient, und lediglich moderat von KIM-1, ein Biomarker für Schäden des proximalen Tubulus, im Urin abgebildet. Die Ergebnisse der Proteinbiomarker im Urin von ZSF1-Ratten bekräftigt somit die zuvor bereits in Frage gestellte Prädiktivität dieser Proteinbiomarkern in verschiedenen Rattenmodellen der Nierenschäden (Vlasakova et al. 2014) und Patienten mit DN. Ebenso bestätigen die Ergebnisse der klassischen und neueren Biomarker erneut die zuvor berichtete und im Rahmen dieser Arbeit auf Genexpressionsebene identifizierte, gute Übereinstimmung des ZSF1-Modell für MetS mit Veränderungen in Patienten mit DN (Bilan et al. 2011; Brosius et al. 2009; Dower et al. 2017).

Zusätzlich zu den bereits diskutierten Parametern und Proteinbiomarkern ist ein Fokus dieser Arbeit miRNAs im Gesamturin und in Exosomen als mögliche Biomarker für CKD. Hierzu wurden zunächst Exosomen aus dem Urin fettleibiger ZSF1-Ratten isoliert. Dabei wurden zwei Isolationsmethoden verglichen. Die Exosomen-Anreicherung aus Urin sowie Zellkulturmedium zeigte allerdings unabhängig von der gewählten Isolationsmethode eine deutliche Ko-Isolation mikrovesikulärer Proteine. Diese Ergebnisse stimmen mit Publikationen überein, welche ebenfalls eine Ko-Isolation von exosomalen und nicht-exosomalen EVs einschließlich Mikrovesikeln für

verschiedene EV-Isolationsmethoden einschließlich der hier verwendeten Präzipitationsmethode und der Größenausschlusschromatographie gezeigt hatten (Buschmann et al. 2018; Iraci et al. 2017; Moon et al. 2019; Peng et al. 2020; Shu et al. 2020). Wie bereits in der Einleitung erläutert, ist eine mögliche Ursache die Überschneidung der Größenprofile von Exosomen, Mikrovesikeln und HDL (Abbasian et al. 2018; Crescitelli et al. 2013; El-Andaloussi et al. 2012), wodurch eine gezielte Isolation durch Methoden, welche auf physikochemischen Eigenschaften der EV beruhen, erschwert wird. Insgesamt wurden demnach im Rahmen dieser Arbeit mehrere EV-Subtypen einschließlich Exosomen und Mikrovesikel aus dem Urin von Ratten und aus dem Zellkulturmedium angereichert. Auch wenn *in vivo* oder *in vitro* veränderte miRNAs so nicht eindeutig einem Vesikel-Subtypen zugeordnet werden können, ist ein Vorteil dieser Ko-Isolation, dass nicht-exosomale EVs mit Biomarkerpotential, einschließlich Mikrovesikel, ebenfalls Teil der miRNA-Analyse sind. So wurde zum Beispiel berichtet, dass Podozyten Mikrovesikel in den Urin freisetzen können, welche einen Nierenschaden früher als etablierte Biomarker anzeigen und so möglicherweise zur Identifikation von Biomarkern für Podozytendysfunktion und glomeruläre Schädigung beitragen können (Burger et al. 2014; Medeiros et al. 2020). Nach Isolation der EVs und Quantifizierung von miRNAs wurden absolute miRNA-Konzentrationen nach der modifizierten  $\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet. Vergleichbar zu den klassischen und neueren Proteinbiomarkern sowie diversen Publikationen zu mRNA Biomarkerkandidaten im Urin beinhaltet diese Auswertung eine Normalisierung auf den Kreatiningehalt des Urins. Diese Normalisierung wird standardmäßig durchgeführt, um die biologische Variabilität zwischen Tieren oder Patienten innerhalb einer Gruppe einzubeziehen. Dieses Vorgehen wird allerdings teilweise kontrovers diskutiert, da sowohl individuelle Schwankungen der Kreatininkonzentrationen als auch starke Effekte des Nierenschadens auf die GFR oder eine Polyurie den Kreatiningehalt des Urins beeinflussen können (Tang et al. 2015; Waikar et al. 2010). Starke Veränderungen des Kreatiningehalts im Urin von Tieren oder Patienten mit Nierenschäden könnten so zu falsch positiven Ergebnissen bei der Biomarkeridentifikation führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden etablierte und neuere Biomarker allerdings dennoch auf den Kreatiningehalt normalisiert, um in Abwesenheit etablierter Alternativen die biologische Variabilität zu adressieren. In fettleibigen Ratten war das Urinvolumen im gleichen Maß erhöht wie die Konzentration von Kreatinin im Urin verglichen zur schlanken Kontrolle reduziert war. Demnach kann angenommen werden, dass der Urin durch eine mögliche Polyurie oder Hyperfiltration in fettleibigen Tieren verdünnter ist als in der Kontrolle. Für die miRNA-Isolation wurde das gleiche Urinvolumen in fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten verwendet. Durch

Normalisierung der absoluten miRNA-Konzentrationen auf Kreatinin wird somit der Effekt der Hyperfiltration bei der miRNA Quantifizierung berücksichtigt. Denn wenn einzelne miRNAs vor der Normalisierung gleiche Konzentrationen in fettleibigen und schlanken Ratten aufweisen, ist die Freisetzung der miRNA in den Urin aufgrund der erhöhten Urinproduktion in fettleibigen ZSF1-Ratten dennoch erhöht. In fettleibigen ZSF1-Ratten zwischen Woche 14 und 26 konnten unerwünschte Effekte der Normalisierung auf die miRNA-Ergebnisse ebenfalls ausgeschlossen werden, da über diesen Zeitraum die Kreatininausscheidung konstant blieb.

Im Gesamturin und Urin-EVs konnten insgesamt 290 veränderte miRNAs in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle identifiziert werden. In Bezug auf die Progression der CKD waren in fettleibigen ZSF1-Ratten 38 miRNAs zwischen dem Alter von 14 und 26 Wochen signifikant verändert. Mehrere dieser miRNAs zeigten dabei einen stärkeren altersabhängigen Anstieg im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten als einige der klassischen und neueren Proteinbiomarker, einschließlich KIM-1. Diese miRNAs könnten somit die Progression der Nierenschädigung in diesem Tiermodell diabetischer und MetS-induzierter Nephropathie besser abbilden als die klassischen und neueren Biomarker und den Goldstandard der CKD-Detektion komplementieren. *In vivo* verbesserte die EV-Anreicherung des Urins das Detektionslevel, erkennbar als niedrigere Ct-Werte in der PCR, und beeinflusste die Anzahl und das Profil signifikant veränderter miRNAs. Ob die erhöhte Konzentration einiger miRNAs nach EV Anreicherung auf eine erhöhte EV-Konzentration des Urins oder auf eine Veränderung der EV-Zusammensetzung zurückzuführen ist, müsste in weiteren Studien adressiert werden. Hinweise auf eine erhöhte EV-Freisetzung in den Urin fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle wurden im Rahmen dieser Arbeit beobachtet. Da dieser Anstieg trotz der deutlich erhöhten Urinausscheidung der Ratten identifiziert wurde, deuten diese Ergebnisse auf eine deutlich erhöhte EV-Freisetzung in fettleibigen ZSF1-Ratten mit CKD hin. Damit entspricht dieses Rattenmodell der humanen Situation, da im Kontext humaner DN und Bluthochdruck-assoziierten CKD ebenfalls erhöhte Exosomenkonzentrationen im Urin berichtet wurden (Gu et al. 2020; Liu et al. 2019b; Yu et al. 2018). Für eine Veränderung der EV-Zusammensetzung aufgrund von Nierenschäden spricht die Reduktion einiger miRNAs in fettleibigen ZSF1-Ratten mit zunehmendem Alter, während andere miRNAs anstiegen. Dieser Effekt kann nicht durch eine alleinige Erhöhung der EV-Produktion und damit sekundär erhöhter miRNA-Freisetzung erklärt werden. Die Hintergründe dieser Beobachtungen müssen in weiteren Studien untersucht werden. Insgesamt könnte eine EV-Anreicherung helfen, Biomarkerkandidaten, welche nur in geringen Mengen im Urin vorhanden sind, zuverlässiger zu detektieren. Der Mehrwert der EV-Anreicherung vor

der Detektion sollte dabei für jede miRNA, welche als potenzieller Biomarker-Kandidat untersucht wird, analysiert werden.

Auf mechanistischer Ebene waren mehrere der veränderten miRNAs zuvor mit renaler Entzündung, Fibrose und glomerulärer Schädigung assoziiert worden. Bei diesen Vorgängen handelt es sich um zentrale und für die Ursache unspezifische pathophysiologische Mechanismen der CKD (Lemley 2016; Meng 2019), deren Aktivierung ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit auf Genexpressionsebene in ZSF1-Ratten gezeigt wurde. Dies entspricht vorherigen Publikationen, nach denen miRNAs im Urin und in Urin-EVs Veränderungen der renalen Physiologie und Pathophysiologie widerspiegeln können (Pavkovic et al. 2014; Wu et al. 2021). Um eine mögliche Assoziation der miRNAs im ZSF1-Urin mit glomerulärer Schädigung und renaler Fibrose weiter zu bekräftigen, wurden miRNA-Profile in ZSF1-Ratten mit publizierten Daten aus einem Rattenmodell für primäre Glomerulonephritis (Pavkovic et al. 2015b) und mit miRNA-Profilen in einem *in vitro*-Modell für renale Fibrose verglichen. Generell muss bei Vergleichen von miRNA-Daten über Studien und Labore beachtet werden, dass unterschiedliches Prozessieren des Urins, die Verwendung unterschiedlicher EV- und miRNA-Isolationsmethoden und die Verwendung unterschiedlicher Normalisierungsmethoden die Ergebnisse der miRNA-Quantifizierung stark beeinflussen und den Vergleich dadurch erschweren können (Kloten et al. 2019). Trotz dieser generellen Limitationen und aufgrund der Tatsache, dass die gleichen Methoden für die Isolation und Analyse verwendet wurden, ergab der Vergleich mit dem Glomerulonephritis-Modell von Pavkovic et al (2015b) eine Übereinstimmung von 60 miRNAs, welche im Urin beider Tiermodelle signifikant anstiegen. Bei den Tiermodellen handelt es sich zum einen um eine sub-akute Nierenschädigung durch Immunsystem vermittelte, primäre Glomerulonephritis und zum anderen um das ZSF1-Modell mit durch Veränderungen des Stoffwechsels und Bluthochdruck induzierter CKD. Dies deutet darauf hin, dass miRNAs als Biomarker für die zugrundeliegenden pathophysiologischen Veränderungen des Gewebes, zum Beispiel für glomeruläre Schädigung, unabhängig von der Ätiologie oder Dauer der Schädigung dienen könnten. Bei dem Vergleich mit der Publikation von Pavkovic et al (2015b) muss allerdings beachtet werden, dass in diesem Tiermodell sekundär zum glomerulären Schaden eine Schädigung des Tubulus beobachtet wurde. Da auch das ZSF1-Modell sowohl durch glomeruläre als auch tubuläre Schädigung charakterisiert ist, kann aktuell keine Schlussfolgerung getroffen werden, welche miRNAs mit welcher Arten der renalen Schädigung zusammenhängen. Um die literaturbasierte Assoziation veränderter miRNA-Konzentrationen im Urin von ZSF1-Ratten mit dem Prozess der Nierenfibrose zu bestärken, wurde zusätzlich ein humanes *in vitro*-Modell für renale

Fibrose verwendet (Ai et al. 2020; Grampp und Goppelt-Struebe 2018). Im Zentrum dieses Modells stehen primäre hRPTECs, welche eine essentielle Rolle in der Entstehung von Nierenfibrose und Albuminurie-induzierten Nephronschäden spielen (Lovisa et al. 2016; Motoyoshi et al. 2008; Takaori et al. 2016). Ein humanes Zellsystem wurde gewählt, da zum einem eine gute Korrelation zwischen humanen Zellen *in vitro* und der Rattenbiologie *in vivo* gezeigt wurde (Jennings et al. 2012), und zum anderen die Humanrelevanz der identifizierten miRNAs mit Assoziation zur renalen Fibrose unterstrichen werden soll. hRPTECs wurden somit mit TGF- $\beta$ , einem nachgewiesenen zentralen Regulator profibrotischer Prozesse (Meng et al. 2016), behandelt. Die Verwendung von TGF- $\beta$  war auch aufgrund der vorangegangenen Genexpressionsanalysen sinnvoll, da im Rahmen dieser Arbeit in 14 bis 59 Wochen alten ZSF1-Ratten eine Induktion dieses Zytokins gezeigt wurde. Die Quantifizierung der Expression verschiedener bekannter Zielgene von TGF- $\beta$  zeigte dabei die Sensitivität der verwendeten hRPTECs gegenüber der TGF- $\beta$  Behandlung, was auf intakte TGF- $\beta$  Signalwege in diesem Zellsystem hindeutete. Nach Behandlung mit TGF- $\beta$  waren mehrere miRNAs intrazellulär, im gesamten Zellkulturmedium oder in Zellkulturmedium nach EV-Anreicherung verändert. Vergleichbar zu den Beobachtungen *in vivo* verbesserte und beeinflusste die EV-Anreicherung des Zellkulturmediums sowohl das Detektionslevel als auch die Anzahl signifikant veränderter miRNAs. Analog muss auch hier in weiterführenden Studien untersucht werden, ob nur die generelle EV-Freisetzung oder auch die miRNA-Konzentration pro EV ansteigt. Für eine erhöhte EV-Freisetzung sprechen verschiedene publizierte Daten, welche sowohl eine generell erhöhte miRNA- als auch EV-Freisetzung durch hRPTECs nach Behandlung mit TGF- $\beta$  und unter Bedingungen des Serum mangels berichteten (Liu et al. 2020b; Müller-Deile et al. 2019; Wang et al. 2010). Als Modell für Albuminurie-induzierte Schäden des Nephrons wurden hRPTECs mit HSA behandelt. Diese Behandlung imitiert wie zuvor publiziert die adversen Effekte erhöhter Albuminkonzentrationen auf proximale Tubuluszellen *in vitro* (Erkan et al. 2001). In dem hier durchgeführten *in vitro*-Versuch fiel der Effekt der HSA-Behandlung hinsichtlich der Expression ausgewählter Zielgene gering aus. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass nicht Albumin alleine, sondern nur in Kombinationen mit weiteren Faktoren wie zum Beispiel mit bestimmten Lipiden und *advanced glycation end products*, kurz AGEs, zur renalen Pathogenese beiträgt (Ruggiero et al. 2014). Auch die HSA-Behandlung induzierte Veränderungen einzelner miRNAs, allerdings zu einem deutlich geringeren Maß als die Behandlung mit TGF- $\beta$ . Die genauen Ursachen dieser Beobachtungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden, die Ergebnisse könnten allerdings darauf hindeuten, dass Albuminurie *in vivo* das miRNA-

Profil des Urins weniger stark beeinflusst als fibrotische Prozesse zusammen mit der Induktion von TGF- $\beta$ .

Während die meisten der hier identifizierten miRNAs generell in der Niere exprimiert sind, wie im Rahmen dieser Arbeit und durch Vergleich zu entsprechenden Studien gezeigt wurde (Bushel et al. 2018; Smith et al. 2016), waren nur sechs miRNAs im Nierengewebe fettleibiger ZSF1-Ratten signifikant verändert. Diese Ergebnisse im Gesamthomogenat der Niere ähneln zuvor publizierten Daten, welche im glomerulusangereicherten Gewebe von 12 bis 41 Wochen alten ZSF1-Ratten lediglich 15 miRNAs als signifikant verändert identifizierten (Dower et al. 2017). Allerdings wurde in dieser Publikation keine Quantifizierung von miRNAs im Urin durchgeführt. Daher ist unbekannt, ob ähnlich zu dieser Arbeit eine fehlende Korrelation zwischen Urin und glomerulusangereichertem Nierengewebe von ZSF1-Ratten zu beobachten gewesen wäre. Ebenso unklar ist, ob einzelne miRNAs in bestimmten renalen Zelltypen dereguliert sind, welche im Gesamthomogenat der Niere oder sogar im glomerulusangereichertem Nierengewebe unterrepräsentiert sind, und somit nicht detektiert werden können. Vergleichbar zu den Ergebnissen der miRNA-Quantifizierung im Urin und Nierengewebe von ZSF1-Ratten waren zahlreiche miRNAs im Zellkulturmedium des *in vitro*-Modells nach Behandlung mit TGF- $\beta$  stark verändert, während diese intrazellulär zwar detektiert wurden, dabei aber überwiegend nicht signifikant verändert waren. Diese fehlende Korrelation zwischen extrazellulären und intrazellulären miRNA-Konzentrationen wurde zuvor bereits sowohl für nicht-renale Zelltypen *in vitro* (Gezer et al. 2014; Mohan et al. 2016) als auch für die Niere *in vivo* gezeigt (Pavkovic et al. 2015b). Dies könnte darauf hindeuten, dass miRNAs im Urin oder Zellkulturmedium entweder durch Schädigung der Zellen mit Verlust der Membranintegrität passiv freigesetzt werden, oder dass durch zeitgleich erhöhte Biogenese und aktive Sekretion von EVs der Gesamtgehalt einer miRNA innerhalb der Zelle konstant bleibt. Dass der Prozess einer erhöhten aktiven Sekretion in ZSF1-Ratten auf Genexpressionsebene reguliert wird, ist basierend auf den hier generierten Daten unwahrscheinlich, da die Expression von EV-Biogenese und –Sekretion assoziierten Genen im Nierengewebe fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle nicht verändert waren. Zudem wurde eine signifikante Zytotoxizität *in vitro* ausgeschlossen. Weitere Studien sind nötig, um dieses Phänomen genauer zu erforschen.

Im folgenden Teil der Diskussion werden nun einzelne miRNAs diskutiert, welche *in vivo* und im *in vitro*-Modellen für renale Fibrose und CKD signifikant verändert waren. Ausgewählt wurden hierfür miRNAs, welche in der Literatur bereits mit renalen Schädigungen in Verbindung gebracht wurden, um sowohl das Potential von miRNAs

als Biomarker für Nierenschäden als auch den Wert des ZSF1-Modells zur Untersuchung potenzieller miRNA-Biomarker hervorzuheben. Zusätzlich sollen miRNAs diskutiert werden, welche bislang kaum mit renaler Pathogenese assoziiert wurden, um neue Biomarkerkandidaten für weiterführende Studien zu identifizieren. Um zudem den potenziellen Effekt der Kreatinin-Normalisierung auszuschließen, werden hierbei ausschließlich miRNAs diskutiert, die sowohl vor als auch nach dieser Normalisierung signifikante Veränderungen zeigten. Eine Übersicht über ausgewählte miRNAs ist im Kapitel „Graphical Abstract“ gezeigt. Unter anderem war miR-145-5p in Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle signifikant erhöht. Außer im ZSF1-Modell wurde diese miRNA ebenfalls im Urin eines Rattenmodells für Glomerulonephritis (Pavkovic et al. 2015b), und in Urin-Exosomen und Glomeruli diabetischer Mäuse als erhöht beschrieben (Barutta et al. 2013). Die Beobachtungen in den Tiermodellen steht dabei in Einklang mit Berichten, welche ebenfalls erhöhte Konzentrationen dieser miRNA in Urin-Exosomen von Patienten mit DN und im Urin von Patienten mit membranöser Glomerulonephritis berichteten (Barutta et al. 2013; Müller-Deile et al. 2019). MiR-145-5p ist dabei hauptsächlich in glomerulären Endothelzellen, Mesangiumzellen, Podozyten, und zu einem geringeren Grad in proximalen Tubuluszellen exprimiert (Chorley et al. 2021b; Müller-Deile et al. 2019). In Übereinstimmung mit der tubulären Expression war miR-145-5p *In vitro* sowohl intrazellulär als auch im gesamten Zellkulturmedium und in EVs des Zellkulturmediums nach Behandlung von hRPTECs mit TGF- $\beta$  erhöht. Der Effekt war verglichen mit den anderen quantifizierten miRNAs am deutlichsten ausgeprägt. Dazu passend spielt miR-145-5p auf mechanistischer Ebene eine antifibrotische und antiapoptotische Rolle in der TGF- $\beta$ - und Glukose-induzierten Transdifferenzierung von hRPTECs (Jia und Wang 2022; Liu et al. 2019a; Liu et al. 2020a), zusätzlich zu einer Rolle in der Schädigung von Podozyten (Wei et al. 2020; Zhang et al. 2021) und der Proliferation und Entzündung von Mesangiumzellen (Wu et al. 2018). Zudem korrelierten erhöhte miR-145-5p Konzentrationen im Urin mit reduzierten *Stc1*-mRNA, eine mögliche Ziel-mRNA dieser miRNA, im Nierengewebe fettleibiger ZSF1-Ratten. Eine Reduktion von *Stc1* wurde zuvor mit ausgeprägter glomerulärer und tubulärer Nekrose assoziiert (Huang et al. 2014; Huang et al. 2015). In Übereinstimmung mit den Genexpressionsanalysen könnte miR-145-5p im Urin somit ein potenzieller Biomarker für renale Fibrose und tubuläre oder glomeruläre Schädigung sowohl in Ratten als auch Patienten mit DN oder Glomerulonephritis sein. Da diese miRNA deutlichere Effekte nach EV-Anreicherung vor der Detektion zeigt, könnte dieser potenzielle miRNA-Biomarker von einer EV-Anreicherung profitieren. Obwohl Schäden und EMT der proximalen Tubuluszellen im Rahmen einer AA-induzierter Nephropathie ebenfalls

beobachtet werden können (Pozdzik et al. 2008), wurden veränderte Urinkonzentrationen von miR-145-5p in Menschen (Karanović et al. 2022) oder Tiermodellen bislang noch nicht gezeigt. Der mögliche Wert dieser miRNA für die Detektion von CKD mit anderer Ätiologie einschließlich AA-Nephropathie muss daher weiter untersucht werden.

MiR-10a-5p war sowohl im Gesamturin als auch in Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten erhöht. Da wie bereits diskutiert fettleibige ZSF1-Ratten mit DN-ähnlichen glomerulären und tubulären Schäden assoziiert sind, könnte diese miRNA mit diesen Veränderungen zusammenhängen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurden erhöhte Konzentrationen von miR-10a-5p ebenfalls im Urin von Rattenmodellen für DN und Glomerulonephritis (Gholaminejad et al. 2018; Mohan et al. 2016; Pavkovic et al. 2015b), sowie im Urin von Patienten mit Diabetes, Glomerulosklerose und Glomerulonephritis beschrieben (Ghai et al. 2018; Müller-Deile et al. 2019; Wang et al. 2012). *In vitro* induziert TGF- $\beta$  miR-10a-5p in Podozyten (Müller-Deile et al. 2019). Hier wurde nun zusätzlich gezeigt, dass die Freisetzung von miR-10a-5p in das Zellkulturmedium nach Behandlung von hRPTECs mit TGF- $\beta$  erhöht ist. Die zudem identifizierte basale Expression in proximalen Tubuluszellen stimmt dabei mit vorherigen Berichten überein, welche eine Anreicherung dieser miRNA im proximalen Tubulus und im Sammelrohr der Niere zeigten (Chorley et al. 2021b; Ho et al. 2008). Die genaue Rolle von miR-10a-5p in der Niere muss noch weiter untersucht werden, doch diese Daten deuten darauf hin, dass miR-10a-5p möglicherweise ein EV-assoziiertes Biomarkerkandidat für glomeruläre oder mit Fibrose assoziierte tubuläre Schädigung in Nagern mit Humanrelevanz sein könnte. Eine potenzielle Anwendung von miR-10a-5p als möglicher Urin-Biomarker für AA-induzierte Nephropathie ist aktuell ebenso noch unzureichend gezeigt worden. Zwar wurden erhöhte Konzentrationen von miR-10a-5p in der Niere AA-behandelter Ratten berichtet (Meng et al. 2014), eine veränderte Konzentration im Urin wurde allerdings bislang nicht gezeigt (Karanović et al. 2022).

Biomarker-Kandidaten im Urin, welche möglicherweise nicht von einer EV-Anreicherung profitieren, sind miR-125b-5p und miR-23a-3p. Beide miRNAs waren sowohl im Gesamturin fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle erhöht, als auch im Gesamturin 26 Wochen alter, fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zu 14 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten. Diese miRNAs könnten somit nicht nur das Vorliegen einer CKD, sondern auch deren Progression abbilden. MiR-125b-5p wurde zuvor bereits im Urin von Ratten mit Glomerulonephritis (Pavkovic et al. 2015b), und im Urin von Patienten mit membranöser Glomerulonephritis als erhöht, sowie als verändert in Urin-EVs und proximalen Tubuluszellen von Patienten mit DN und



Glomerulosklerose beschrieben worden (Baker et al. 2017; Ghai et al. 2018; Müller-Deile et al. 2019; Zang et al. 2019). Auf funktioneller Ebene ist miR-125b-5p *in vitro* mit TGF- $\beta$  und Glukose-induzierter Schädigung von Mesangiumzellen, Podozyten und hRPTECs (Huang et al. 2016; Müller-Deile et al. 2019), sowie mit einer protektiven Funktion in tubulären Zellen (Gao et al. 2021; Xu et al. 2021) assoziiert. Die Relevanz dieser miRNA für verschiedene renale Zelltypen wird durch eine unspezifische Expression dieser miRNA in glomerulären und tubulären Zellen in gesunden und Ratten mit DN *in vivo* unterstützt (Chorley et al. 2021b; Ishii et al. 2021). MiR-125b-5p könnte demnach ein Biomarker für glomeruläre oder tubuläre Schädigung im Gesamturin sein, welcher potenziell mit renalen Fibrose und Glukose-induzierten pathophysiologischen Mechanismen in der Niere von ZSF1-Ratten assoziiert ist. Obwohl zuvor vergleichbare pathophysiologische Mechanismen einer diabetischen und AA-induzierten Nephropathie in Ratten auf Genexpressionsebene gezeigt wurde, wurden bislang keine veränderten miR-125b-5p Konzentrationen im Urin oder Nierengewebe AA-exponierter Ratten oder Menschen berichtet. Ob diese miRNA demnach spezifisch für die Ursache der CKD ist oder unabhängig von der Ätiologie für die genannten renalen Schädigungsprozesse dienen könnte, muss in Zukunft weiter untersucht werden.

MiR-23a-3p ist im Glomerulus angereichert und stieg außer im Gesamturin von ZSF1-Ratten ebenfalls im Urin zweier Rattenmodelle für Glomerulonephritis und in Urin-EVs von Patienten mit DN signifikant an (Cho et al. 2021; Chorley et al. 2021b). Eine potenzielle Assoziation mit glomerulären Schäden wird durch eine Induktion dieser miRNA in humanen Podozyten *in vitro* nach Behandlung mit TGF- $\beta$  bekräftigt (Müller-Deile et al. 2019). Die hier generierten Daten deuten zusätzlich darauf hin, dass diese miRNAs möglicherweise mit der TGF- $\beta$  vermittelten Fibrose von proximalen Tubuluszellen in Verbindung stehen. Auf mechanistischer Ebene könnte diese miRNA profibrotische Prozesse in proximalen Tubuluszellen durch Regulation der Fibronektin-Expression beeinflussen (Sheng et al. 2021). Bislang wurde in einem diabetischen Rattenmodell eine reduzierte Nierenschädigung nach Überexpression von miR-23a-3p gezeigt (Chang et al. 2021). Diese könnte eventuell auf eine Veränderung der Entzündungsreaktion der Niere zurückzuführen sein, da im Rahmen dieser Arbeit Bcl6 als mögliches Ziel für den miRNA-vermittelten Abbau identifiziert wurde und Bcl6 ein Regulator der renalen Entzündung ist (Chen et al. 2017b). Dies fügt sich in das Gesamtbild verschiedener publizierter Daten ein, in denen für miR-23a-3p Ziel-mRNAs mit Assoziation zur Pyroptose, Apoptose und Zytokinproduktion durch Immunzellen und proximale Tubuluszellen identifiziert wurden (Chang et al. 2021; Sheng et al. 2021; Shi et al. 2021). Zusammenfassend ist miR-23a-3p im Gesamturin ein potenzieller

Biomarker für glomeruläre und tubuläre Schäden, welche gegebenenfalls mit Entzündungsreaktionen und profibrotischen Prozessen in der Niere korrelieren. MiR-23a-3p wurde bislang nicht mit AA-Nephropathie in Verbindung gebracht und dessen Biomarker-Potential in dieser Art der Nierenschäden muss in weiteren Studien adressiert werden.

Des Weiteren stieg miR-184 sowohl im Nierengewebe als auch im Gesamturin fettleibiger ZSF1-Ratten relativ zur schlanken Kontrolle und in fettleibigen ZSF1-Ratten mit zunehmendem Alter an. Erhöhte miR-184 Konzentrationen im Nierengewebe wurden zuvor ebenfalls in ZDF-Ratten, einem anderen Modell für Typ-2-Diabetes, berichtet (Zanchi et al. 2017), und im Urin zweier Rattenmodelle für Glomerulonephritis als erhöht beschrieben, während Toxine mit Selektivität für andere Nephron-Abschnitte die Konzentration dieser miRNA im Urin nicht beeinflussten (Chorley et al. 2021b; Pavkovic et al. 2015b). In Übereinstimmungen mit diesen Ergebnissen in den Tiermodellen wurde erhöhte miR-184 Konzentrationen im Urin von Patienten mit fokaler segmentaler Glomerulosklerose, membranöser Glomerulonephritis und AA-induzierter Nephropathie identifiziert (Karanović et al. 2022; Müller-Deile et al. 2019). Diese miRNA ist sowohl in glomerulären Zellen und proximalen Tubuluszellen exprimiert, zeigt allerdings eine deutliche Anreicherung im Glomerulus (Chorley et al. 2021b; Müller-Deile et al. 2019). In beiden Zelltypen kann miR-184 durch TGF- $\beta$  induziert werden (Müller-Deile et al. 2019). Neuste Publikationen bringen dabei erhöhte miR-184 Konzentrationen mit profibrotischen Prozessen proximaler Tubuluszellen in Verbindung (Chen 2019), zum Beispiel im Rahmen Albuminurie-induzierter renaler Fibrose im Rahmen einer DN (Zanchi et al. 2017). Die intrazelluläre Induktion in proximalen Tubuluszellen durch Behandlung mit TGF- $\beta$  konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden, jedoch konnte in dem hier verwendeten *in vitro*-Modell für Nierenfibrose eine erhöhte Freisetzung von miR-184 in das Zellkulturmedium gezeigt werden. MiR-184 ist somit ein möglicher Biomarker für die Progression der MetS-assoziierten CKD und DN, sowie für renale Fibrose und glomeruläre Schäden in ZSF1-Ratten. Zudem könnte diese miRNA ebenfalls als Urin-basierte Biomarker für AA-induzierte Nephropathie dienen. Der Vergleich der miRNA-Profile in Gesamturin und Urin-EVs deutet dabei darauf hin, dass eine Detektion dieses möglichen Biomarkers im Gesamturin erfolgen sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden des Weiteren mehrere miRNAs im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten identifiziert, welche bislang zwar noch nicht in einen deutlichen Zusammenhang mit der renalen Pathogenese gebracht wurden, jedoch mögliche weitere Biomarker-Kandidaten für CKD sein könnten. Zu diesen gehört unter anderem miR-323a-5p, welche im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten nach EV-Anreicherung über die

Zeit und verglichen zur schlanken Kontrolle erhöht war. Diese miRNA ist in der Niere exprimiert (Eissa et al. 2016), aber bislang existiert keine publizierte Assoziation mit der renalen Physiologie oder Pathologie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für miR-323a-5p sowie sieben weitere miRNAs in Urin-EVs und 13 miRNAs im Gesamturin fettleibiger ZSF1-Ratten vorhergesagt, dass sie *Stc1*-mRNA binden und deren Abbau induzieren können. In Übereinstimmung war *Stc1*-mRNA im Nierengewebe von 14, 22 und 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Tieren relativ zur Kontrolle signifikant reduziert. *STC1* ist ein protektives Protein, welches die Produktion von Superoxid reduziert und die endotheliale Integrität fördert (Chen et al. 2008). Eine Reduktion von *STC1* wurde zuvor mit schwerer glomerulärer und tubulärer Nekrose assoziiert (Huang et al. 2014; Huang et al. 2015). Diese miRNAs einschließlich miR-323a-5p könnten somit als mögliche Biomarker für eine Reduktion nierenschützender Prozesse dienen. Zudem wurden weitere potenzielle Biomarkerkandidaten einschließlich miR-291a-3p im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten identifiziert, welche möglicherweise die Synthese der immunsystemassoziierten Proteine *Bcl6* und *Cxcl12* (Bunting und Melnick 2013; Zielińska und Katanaev 2020) inhibieren könnten. Eine Veränderung von miR-291a-3p im Urin fettleibiger Ratten könnte somit als möglicher Biomarker für Entzündungsprozesse der Niere diskutiert werden. Weitere Studien werden allerdings benötigt, um diese Assoziationen zu bestätigen.

Generell wird angenommen, dass EV-assoziierte miRNAs im Urin ausschließlich durch renale Zellen entlang des Nephrons freigesetzt werden (Erdbrügger et al. 2021; Miranda et al. 2014). Während manche Studienergebnisse mit dieser Annahme übereinstimmen (Pavkovic et al. 2014; Thompson et al. 2016), wird dieser Punkt in anderen Publikationen teils kontrovers diskutiert (Pazourkova et al. 2016; Wolenski et al. 2017; Zhou et al. 2013). Zum Beispiel wurde berichtet, dass miR-122-5p sowohl in Blut- als auch in Urin-EVs als möglicher Biomarker für Leberschäden detektiert werden kann (Carroll et al. 2018; Matthews et al. 2020). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls erhöhte miR-122-5p Konzentrationen im Gesamturin fettleibiger ZSF1-Ratten festgestellt. Obwohl diese miRNA ebenfalls eine aktive Rolle in der renalen Pathophysiologie spielen kann (Yuan et al. 2020), kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass miR-122 aufgrund der zuvor diskutierten steatotischen Leberschädigung in fettleibigen ZSF1-Ratten im Urin ansteigt. Weitere Vergleiche von miRNA-Profilen im Urin zu Profilen im Plasma sind nötig, um die Nierenspezifität der identifizierten miRNAs, von denen die meisten mit verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen der Niere in Verbindung gebracht werden konnten, zu bestätigen.

In der Summe unterstützen der Vergleich mit einem Rattenmodell für primäre Glomerulonephritis und die Ergebnisse der *in vitro*-Modelle eine mögliche Assoziation veränderter miRNAs im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten mit glomerulären und tubulären Schädigung sowie dem Prozess der renalen Fibrose und Entzündung. MiRNAs im Urin, nicht aber im Nierengewebe, könnten somit zur Diagnose einer CKD und deren altersabhängige Progression im ZSF1-Modell beitragen. MiRNAs könnten die Progression von CKD dabei möglicherweise besser abbilden als manche etablierte Parameter oder neuere Proteinbiomarker und diese komplementieren. Eine Anreicherung von Urin-EVs vor der Quantifizierung von miRNAs könnte sowohl die Detektionsgrenzen erniedrigen, als auch das Profil veränderter miRNAs beeinflussen und somit einen Mehrwert für die Identifizierung bestimmter miRNA-Biomarker darstellen. Zudem wurden mehrere miRNAs identifiziert, welche sowohl in Ratten als auch in Patienten mit DN und Glomerulonephritis im Zusammenhang stehen. Diese Ergebnisse zeigen hiermit den Wert des ZSF1-Rattenmodells für MetS und DN für die Erforschung von zuvor beschriebenen sowie neuen miRNA-Biomarkern mit möglicher Humanrelevanz. Das mögliche Potential einzelner miRNAs als Biomarker in AA-induzierter Nephropathie wurde ebenfalls identifiziert, weitere Studien sind allerdings nötig, um dieses in Tiermodellen und Patienten zu bestätigen.

Sowohl ZSF1-Ratten als auch L-NAME behandelte mRenTG-Ratten sind durch deutlich erhöhten Blutdruck charakterisiert (Griffin et al. 2007; Kolkhof et al. 2021). Im ZSF1-Rattenmodell entwickeln jedoch sowohl fettleibige als auch schlanke Ratten Bluthochdruck (Bilan et al. 2011; Leite et al. 2019; Prabhakar et al. 2007; Tofovic et al. 2000) und es wurde gezeigt, dass die Entwicklung der CKD in diesem Tiermodell größtenteils unabhängig vom Blutdruck erfolgt (Griffin et al. 2007). Durch die Normalisierung der miRNAs im Urin fettleibiger ZSF1-Ratten auf die ebenfalls hypertensiven Kontrolltiere und aufgrund einer blutdruckunabhängige Pathogenese könnte somit die Identifikation von miRNAs mit direkter oder indirekter Assoziation zu Bluthochdruck im ZSF1-Modell erschwert sein. Daher wurden miRNA-Profile in hypertensiven mRenTG-Ratten untersucht, um mögliche miRNAs mit direkter Assoziation zur blutdruckinduzierten Pathogenese als Biomarkerkandidaten im Urin zu identifizieren. Wie auch im ZSF1-Modell ergaben die Untersuchungen der klinischen Chemie Parameter eine erhöhte Proteinausscheidung über den Urin in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME bei zeitgleich erhöhter Urinausscheidung verglichen zum Behandlungsstart und zur Wildtyp-Kontrolle. Beide Beobachtungen bestätigen dabei publizierte Daten für mRenTG-Ratten ohne zusätzliche eNOS-Inhibition (Advani et al. 2007; Appelhoff et al. 2010; Čertíková Chábová et al. 2019). In mRenTG-Ratten waren nach achtwöchiger Behandlung mit

dem eNOS-Inhibitor L-NAME insgesamt acht miRNAs in Urin-EVs relativ zur Wildtyp-Kontrolle verändert. Dies steht im deutlichen Kontrast zu den 230 veränderten miRNAs in Urin-EVs des ZSF1-Rattenmodells. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit, dass sich trotz der ähnlichen Veränderungen der renalen Genexpression und der mikroskopischen Veränderungen der Gewebestruktur, der erhöhten Urinausscheidung und Proteinurie im ZSF1-Modell für MetS und DN und im mRenTG-Modell für Bluthochdruck das miRNA-Profil im Urin deutlich unterscheidet.

Drei der acht miRNAs in mRenTG-Ratten wurden zuvor bereits im Kontext renaler Pathogenese beschrieben. Unter anderem war miR-138-5p in Urin-EVs L-NAME behandelter mRenTG-Ratten signifikant reduziert. Dieser Effekt war spezifisch für dieses Rattenmodell, da signifikante Veränderungen im ZSF1-Rattenmodell nicht identifiziert werden konnten. Bislang wurden erhöhte Konzentrationen von miR-138-5p im Urin von Patienten mit Glomerulonephritis, Glomerulosklerose und DN (Müller-Deile et al. 2019), sowie im Urin zweier Tiermodelle für Glomerulonephritis (Pavkovic et al. 2015b; Zhou et al. 2016) beschrieben. In Übereinstimmung mit der möglichen Assoziation der miRNA mit glomerulären Schäden wurde eine glomeruläre Expression dieser miRNA in Ratten gezeigt (Chorley et al. 2021b). Auf mechanistischer Ebene ist bislang bekannt, dass miR-138-5p die Aktivität der eNOS in Endothelzellen reduzieren kann (Li et al. 2017), und dass eine reduzierte eNOS-Aktivität sowohl in Endothelzellen als auch in Podozyten mit glomerulären Schäden assoziiert ist (Nakayama et al. 2009; Ueda et al. 2015). Die reduzierte Konzentration von miR-138-5p in Urin-EVs könnten als potenzieller Biomarker für eine glomeruläre Schädigung mit Assoziation zu einer durch die Behandlung mit L-NAME veränderten eNOS-Aktivität in Endothelzellen und Podozyten und für Bluthochdruck dienen. Da die miRNA-Profile im Gesamturin der mRenTG-Ratten in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, kann ein Vorteil einer EV-Anreicherung für die Detektion nicht gezeigt werden und sollte in weiteren Studien analysiert werden. Da diese miRNA ebenfalls in Patienten mit DN identifiziert wurde, sollte zudem die Ursache des fehlenden Anstiegs in ZSF1-Ratten identifiziert werden, um das Biomarkerpotenzial von miR-138-5p für Ätiologie-spezifische CKD genauer zu untersuchen.

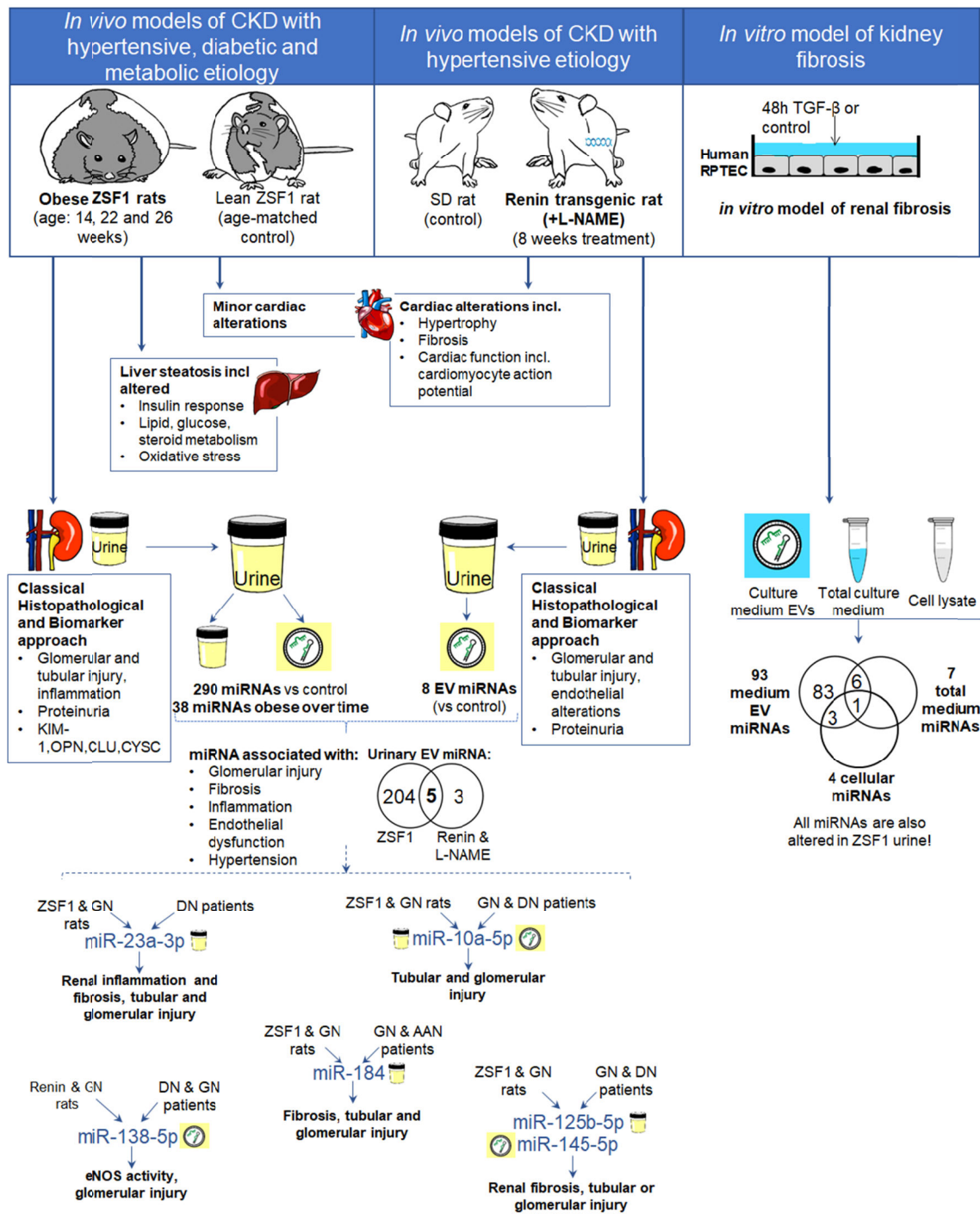
## Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNAs) sind Regulatoren der Genexpression und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Homöostase und Pathogenese. Im Urin können miRNAs in Proteinkomplexen oder in extrazellulären Vesikeln (EVs) gefunden werden. Zur Evaluierung von miRNAs im Urin als Biomarker für chronische Nierenerkrankungen (CKD) wurden miRNA-Profile zweier Rattenmodelle für CKD, den ZSF1-Ratten als Modell für das metabolische Syndrom und diabetische Nephropathie, und Renin-2 transgenen (mRenTG) Ratten als Modell für Bluthochdruck, analysiert. Zusätzlich wurde der Mehrwert der EV-Anreicherung untersucht und eine potenzielle Assoziation der miRNAs mit renaler Fibrose in einem *in vitro*-Modell adressiert. Zur vollständigen Charakterisierung der Tiermodelle wurde die Genexpression in Leber und Herz von ZSF1-Ratten sowie im Herz von mRenTG-Ratten bestimmt. In beiden Tiermodellen konnte eine renale Schädigung einschließlich Fibrose, Entzündung, glomeruläre Schäden und veränderte Nierenfunktion gezeigt werden. Die renale Genexpression in ZSF1-Ratten war dabei größtenteils vergleichbar zu mRenTG-Ratten, Tiermodellen für AA-induzierter Nephropathie und Glomerulonephritis sowie zu Patienten mit diabetischer Nephropathie, was auf generelle Pathomechanismen der CKD hindeutet. Im Gesamturin und Urin-EVs waren insgesamt 290 miRNAs in fettleibigen ZSF1-Ratten relativ zur Kontrolle erhöht, während 38 miRNAs mit zunehmender Progression der CKD verändert waren. Zu diesen gehörten unter anderem miR-10a-5p und miR-125b-5p. MiRNAs korrelierten dabei besser mit der CKD-Progression in ZSF1-Ratten als Proteinbiomarker. Mehrere miRNAs in ZSF1-Ratten wurden zuvor in Patienten mit diabetischer und AA-induzierter Nephropathie sowie in Ratten mit Glomerulonephritis beschrieben, und sind assoziiert mit renaler Fibrose, Entzündungsprozessen und glomerulären Schäden. EV-Anreicherung war von Vorteil für die Identifikation ausgewählter miRNAs. Parallel wurden im ZSF1-Modell moderate Veränderungen der Leber identifiziert, welche auf eine Lebersteatose hindeuten. Trotz der vergleichbaren renalen Schädigung waren nur acht miRNAs in Urin-EVs der mRenTG-Ratten verändert, von denen eine mit endothelialer Dysfunktion assoziiert war. MRenTG-Ratten waren zusätzlich gekennzeichnet durch Hypertrophie, Fibrose und veränderter Funktion des Herzens. Zusammenfassend zeigt dies den Wert des ZSF1- und mRenTG-Rattenmodells, sowie des *in vitro*-Modells, für die humanrelevante, präklinische Biomarker- und Grundlagenforschung. Die hier erhobenen Daten und deren Vergleich mit der Literatur zeigen ein klares Potential bestimmter miRNAs im Gesamturin und Urin-EVs als translationale Biomarker für Ätiologie-übergreifende pathophysiologische Mechanismen, aber auch Ätiologie-abhängige CKD, mit höherer Sensitivität hinsichtlich des Krankheitsverlaufes als validierte Proteinbiomarker.

## Summary

MicroRNAs (miRNAs) are regulators of gene expression and play an important role in body homeostasis and disease. In urine, miRNAs can be found in protein complexes or extracellular vesicles (EVs). To investigate the value of miRNAs as biomarkers for CKD, we compared urinary protein biomarkers for kidney injury with urinary miRNA profiles in two models of chronic kidney disease (CKD). One model reflects the metabolic syndrome including diabetic nephropathy (ZSF1 rats), and the other essential hypertension (renin transgenic rats). We furthermore assessed the benefit of urinary EV enrichment and the association of affected miRNAs with renal fibrosis in an *in vitro* model. In addition to renal pathology, we investigated gene expression alterations in the liver of ZSF1 rats and the heart and kidney of ZSF1 and mRenTG rats to fully characterize these disease models. Herewith we confirmed pronounced kidney injury in obese ZSF1 rats including renal fibrosis, inflammation, glomerular injury and altered renal function. The majority of the gene expression alterations were comparable to mRenTG rats, disease models for aristolochic acid-induced nephropathy and glomerulonephritis, and to human diabetic nephropathy. In total urine and urinary EVs combined, we found 290 miRNAs increased in ZSF1 obese compared lean rats, and 38 miRNAs altered during disease progression in obese ZSF1 rats between week 14 and 26. Examples of affected miRNAs are miR-10a-5p and miR-125b-5p. MiRNAs altered between 14 and 26 weeks correlated better with disease progression than established protein biomarkers. Several miRNAs identified here were previously reported in patients with diabetic and aristolochic acid-induced nephropathy and animal models of glomerulonephritis, and were associated with renal inflammation, fibrosis and glomerular injury. This underlines the potential of miRNA as biomarkers of renal pathophysiological mechanisms across different etiologies. EV enrichment showed a benefit on the detection of selected miRNA biomarker candidates. Renal alterations in ZSF1 rats were paralleled by gene expression alterations indicating liver steatosis and moderate changes in the heart. Despite similar renal injury only eight miRNAs were changed in urinary EVs of renin transgenic rats, including one associated with endothelial dysfunction. Renal alterations were paralleled by cardiac hypertrophy, fibrosis and altered cardiac function in renin transgenic rats, overall validating these models also for metabolic syndrome (ZSF1) and hypertension (Renin transgenic)-related diseases. In summary, these results show the value of the ZSF1 and renin transgenic rat model, together with an *in vitro* model, for preclinical miRNA biomarker discovery and research for CKD with human relevance. The combination of our results with published data suggests the potential of specific urinary miRNAs as translational biomarkers for general pathophysiological mechanisms as well as for etiology specific CKD with potentially higher sensitivity for injury progression than validated protein biomarkers.

# Graphical Abstract



CKD: Chronic kidney disease- SD: Sprague-Dawley rat. L-NAME: N(w)-nitro-L-arginine methyl ester. RPTEC: Renal proximal tubular epithelial cells. TGF- $\beta$ : Tumor necrosis factor beta. miRNA: microRNA. EV: Extracellular vesicles. GN: Glomerulonephritis. AAN: Aristolochic acid-induced nephropathy. eNOS: endothelial NO synthase. DN: Diabetic nephropathy. KIM-1: Kidney injury molecule 1. OPN: Osteopontin. CLU: Clusterin, CYSC: Cystatin C.



## Limitationen und Ausblick

In der Summe wurde hier das Potential mehrerer miRNAs im Gesamturin und Urin-EVs als Biomarker für CKD, und deren mögliche Assoziation mit verschiedenen renalen Schädigungsprozessen gezeigt. Wie allerdings schon Goethe sagte „*liebt [man] Ursache und Wirkung zu verwechseln*“ (Goethe 1831). Denn, ob die identifizierten miRNAs aktiv in den Krankheitsverlauf der CKD eingreifen oder ob sie ein Produkt der Nierenschädigung ohne aktive Rolle in der Pathogenese sind, bleibt eine zentrale Fragestellung für tiefere mechanistische Analysen *in vivo* und *in vitro*. Hierbei könnten zum Beispiel *in vitro* verschiedene renale Zelltypen mit miRNA-Analoga, Antagomirs, EVs aus TGF- $\beta$  behandelten Zellen oder mit EVs aus dem Urin fettleibiger ZSF1-Ratten inkubiert und auf Veränderungen der zellulären Physiologie untersucht werden. *In vivo* könnte zudem durch *in situ*-Hybridisierung die Expression ausgewählter miRNA-Kandidaten in verschiedenen renalen Zelltypen und Strukturen untersucht werden, um deren potenziellen zellulären Ursprung in physiologischen und CKD-Bedingungen zu identifizieren. Weitere offene Fragen sind zudem, ab welchem Zeitpunkt oder Stadium der CKD die miRNA-Veränderungen das erste Mal in den verschiedenen Tiermodellen auftreten, und ob sich im Rahmen der CKD-Progression im Urin die miRNA-Zusammensetzung pro EV, die Gesamtanzahl der EVs im Urin oder beide Parameter ändern. Unter anderem sollten hierbei auch systematische miRNA Quantifizierungen in verschiedenen Tiermodellen einschließlich AA-induzierter Nephropathie durchgeführt werden, um die Ätiologie-Abhängigkeit der miRNA-Veränderungen weiter zu untersuchen. Zudem wurden in dieser Arbeit nur männliche Ratten untersucht, während weibliche Tiere von der Analyse ausgeschlossen waren. Allerdings hat das Geschlecht sowohl einen signifikanten Einfluss auf renale Biomarker für Nierenschäden und miRNA Profile im Urin als auch auf die renale Pathogenese selbst (Ben-Dov et al. 2016; Gautier et al. 2014; Johnson et al. 2011). Demnach müssen in weitere Studien potenzielle miRNA-Biomarker in männlichen und weiblichen Ratten verglichen werden, um deren Potential als Biomarker in Abhängigkeit vom Geschlecht vollständig zu verstehen. Zur finalen Validierung von miRNAs als CKD-Biomarker in verschiedenen männlichen und weiblichen Krankheitsmodellen, Spezies und Krankheitsstadien ist ähnlich zu den neueren Proteinbiomarkern internationales Konsortium nötig, um mittels verschiedener Isolationsmethoden, Detektionsmethoden und Normalisierungsansätzen die Anwendbarkeit und den zusätzlichen Nutzen von miRNAs als Urin-basierte Biomarker für renale pathophysiologische Prozesse wie Fibrose, glomeruläre Schäden, Entzündung oder eine endotheliale Dysfunktion zu evaluieren.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei allen Kollegen, Familie und Freunden bedanken, welche mich durch die Promotion begleitet haben. Besonders nennen möchte ich an dieser Stelle Prof. Dr. Gabriele Schmuck und Prof. Dr. Gerhard Fritz, die mich nicht nur während der Promotion unterstützt haben, sondern durch deren inspirierende Vorlesungen ich meinen beruflichen Weg gefunden habe. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Heidrun Ellinger-Ziegelbauer, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte und mit großem Engagement unterstützt hat. Ich habe sehr viel von ihr lernen dürfen, und schon jetzt begleiten und unterstützen mich diese Erfahrungen auf meinen beruflichen Weg. Zudem möchte ich mich bei Dr. Thomas Steger-Hartmann bedanken, der mir die Promotion in einem so angenehmen und interessanten Umfeld ermöglicht hat. Bedanken möchte ich mich auch bei allen meinen Kollegen und Kolleginnen, die mich so herzlich in ihre Gruppe aufgenommen und im Labor unterstützt haben. Und zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die auf dem Weg des Lebens immer an meiner Seiten waren.

Sie alle haben dazu beigetragen, dass die Promotion zu einer ganz besonderen Zeit geworden ist, aus der ich viel für meine Zukunft mitnehmen durfte.

Danke!

## **Eidesstaatliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ferner versichere ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe, sowie dass die Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung an einer in- oder ausländischen Fakultät vorgelegt wurde.

Düsseldorf, den .....

Unterschrift (Barbara Petzuch)

# Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Übersicht über die Nierenfunktion (Thomas 2019) und -Pathogenese, exemplarisch dargestellt als diabetische Nierenschädigung (Nicholson et al. 2021). Englische Beschriftung wurde im Rahmen dieser Arbeit ins Deutsche übersetzt. ....</i>	<i>- 2 -</i>
<i>Abbildung 2: Das Metabolische Syndrom und Essentieller Bluthochdruck am Beispiel von ZSF1 und mRenTG-Ratten.....</i>	<i>- 7 -</i>
<i>Abbildung 3: Biogenese und Funktion von miRNAs und Mikrovesikel .....</i>	<i>- 15 -</i>
<i>Abbildung 4: Histopathologische Befunde in Niere und Leber von 26 Wochen alten fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten.....</i>	<i>- 60 -</i>
<i>Abbildung 5: Histopathologische Befunde in Niere und Herz von mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit Captopril oder L-NAME. ....</i>	<i>- 61 -</i>
<i>Abbildung 6: Entwicklung des Körpergewicht, der Urinausscheidung, der Urin-Kreatinin-Konzentration und des Gesamtproteingehaltes in mRenTG-Ratten über die Studiendauer. ....</i>	<i>- 63 -</i>
<i>Abbildung 7: Entwicklung des Körpergewicht, der Urinproduktion, der Urin-Kreatinin-Konzentration, des Gesamtproteingehaltes und neuerer Protein-Biomarker für Nierenschäden in ZSF1-Ratten über die Studiendauer. ....</i>	<i>- 64 -</i>
<i>Abbildung 8: Anzahl signifikant veränderter Gene in Niere, Herz und Leber in mRenTG- und ZSF1-Ratten .....</i>	<i>- 66 -</i>
<i>Abbildung 9: Genexpression im Herzen von mRenTG- und ZSF1-Ratten.....</i>	<i>- 68 -</i>
<i>Abbildung 10: Genexpression in der Leber von ZSF1-Ratten.....</i>	<i>- 71 -</i>
<i>Abbildung 11: IPA-Analyse der hepatischen Genexpression in ZSF1-Ratten.....</i>	<i>- 73 -</i>
<i>Abbildung 12: Ergebnisse der WGCNA-Analyse der hepatischen Genexpression in ZSF1-Ratten .....</i>	<i>- 74 -</i>
<i>Abbildung 13: Übersicht über alle verwendeten Studien für die Analyse der renalen Genexpression.....</i>	<i>- 76 -</i>
<i>Abbildung 14: Genexpression in der Niere von mRenTG- und ZSF1-Ratten und Vergleich zu Rattenmodellen für Glomerulonephritis und AA-Nephropathie.....</i>	<i>- 77 -</i>
<i>Abbildung 15: IPA-Analyse der Niere in ZSF1- und mRenTG-Ratten und Ratten-modellen AA-induzierter Nephropathie und Glomerulonephritis .....</i>	<i>- 80 -</i>
<i>Abbildung 16: Ergebnisse der WGCNA-Analyse in der Niere von ZSF1-Ratten, mRenTG-Ratten und je einem Tiermodell für Glomerulosklerose und AA-induzierter Nephropathie .....</i>	<i>- 82 -</i>
<i>Abbildung 17: Genexpression in der Niere in ZSF1- Ratten und Glomeruli und Tubuli von Patienten mit diabetischer Nephropathie.....</i>	<i>- 84 -</i>
<i>Abbildung 18: Quantifizierung EV-assoziiertes Proteine im Urin von ZSF1-Ratten .....</i>	<i>- 86 -</i>
<i>Abbildung 19: miRNA Ct-werte und Vergleich drei verschiedener miRNA Normalisierungsmethoden im Urin von ZSF1-Ratten .....</i>	<i>- 88 -</i>
<i>Abbildung 20: Veränderte miRNAs im Gesamturin und Urin-EVs von ZSF1-Ratten .....</i>	<i>- 90 -</i>
<i>Abbildung 21: Veränderter miRNAs in Urin-EVs von mRenTG-Ratten nach L-NAME Behandlung und Vergleich zum miRNA-Profil in ZSF1-Ratten.....</i>	<i>- 95 -</i>
<i>Abbildung 22: Funktionelle Annotation veränderter miRNAs im Urin von ZSF1- und mRenTG-Ratten.....</i>	<i>- 97 -</i>
<i>Abbildung 23: Funktionelle Annotation potenzieller Ziel-mRNAs von miRNAs im Urin von ZSF1-Ratten .....</i>	<i>- 100 -</i>
<i>Abbildung 24: Vergleich von miRNAs im Urin eines Rattenmodells für Glomerulonephritis und von ZSF1-Ratten. -</i>	<i>103 -</i>
<i>Abbildung 25: Zellmorphologie, Zellviabilität und intrazellulärer mRNA nach Behandlung renaler proximaler Tubuluszellen mit TGF-<math>\beta</math>1 und HSA .....</i>	<i>- 105 -</i>

<i>Abbildung 26: Quantifizierung von intrazellulärer mRNA und miRNA im konditioniertem Medium und Zellen nach Behandlung renaler proximaler Tubuluszellen mit TGF-<math>\beta</math>1</i> .....	- 107 -
<i>Anhang-Abbildung 27: Methodenvergleich EV-miRNA Isolation</i> .....	XLVIII
<i>Anhang-Abbildung 28: IPA-Analyse es Herzens In ZSF1- und mRenTG-Ratten</i> .....	XLVIII
<i>Anhang-Abbildung 29: Expression kardialer Genen mit Bedeutung in der Fettsäureoxidation, dem KLF15 signalweg und der mitochondrialen Atmungskette in ZSF1- und mRenTG-Ratten.</i> .....	XLIX
<i>Anhang-Abbildung 30: Ergebnisse Der WGCNA-Analyse in der Leber von ZSF1-Ratten</i> .....	XLIX
<i>ANHANG-ABBILDUNG 31: ANZAHL DEREGULIERTER GENE IN DER NIERE VERSCHIEDENER TIERMODELLE FÜR NIERENSCHÄDENL</i>	
<i>Anhang-Abbildung 32: IPA-Analyse der Niere In ZSF1- und mRenTG-Ratten, und Rattenmodellen AA-induzierter Nephropathie und Glomerulonephritis</i> .....	L
<i>Anhang-Abbildung 33: Renale Genexpression in ZSF1-Ratten, und in Glomeruli und Tubuli von Patienten mit diabetischer Nephropathie</i> .....	LI
<i>Anhang-Abbildung 34: Übersicht Studien Urin-miRNAs</i> .....	LI
<i>Anhang-Abbildung 35: miRNAs im Nierengewebe von ZSF1-Ratten</i> .....	LII
<i>Anhang-Abbildung 36: Hauptkomponenten-Analyse basierend auf deregulierten miRNAs in ZSF1 Urin-EVs und Gesamturin</i> .....	LII
<i>Anhang-Abbildung 37: Studiendesign, Genexpression nach HSA-Behandlung und miRNA-Profile in hRPTECs und Zellkulturmedium nach Behandlung mit TGF-<math>\beta</math> und HSA.</i> .....	LIII

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Reagenzien und Chemikalien</i> .....	- 23 -
<i>Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien</i> .....	- 24 -
<i>Tabelle 3: Kits und Mikroarrays</i> .....	- 25 -
<i>Tabelle 4: Selection of PCR Assays und Oligonukleotide</i> .....	- 26 -
<i>Tabelle 5: Geräte</i> .....	- 27 -
<i>Tabelle 6: Software und Webapplikationen</i> .....	- 28 -
<i>Tabelle 7: Überblick über Behandlungsgruppen des mRenTG-Rattenmodells und verwendete Kontrollen</i> .....	- 30 -
<i>Tabelle 8: Spezifikationen für die RNA Isolation aus Gewebehomogenat</i> .....	- 38 -
<i>Tabelle 9: Reverse Transkription und Taqman<sup>®</sup>-basierte qRT-PCR von mRNA</i> .....	- 43 -
<i>Tabelle 10: LNA<sup>TM</sup>-Technologie basierte reverse Transkription und SYBR<sup>®</sup>-Green basierte qRT-PCR von miRNA (Panel)</i> .....	- 45 -
<i>Tabelle 11: Reverse Transkription für Mikroarrays</i> .....	- 51 -
<i>Tabelle 12: In vitro- und reverse Transkription für Mikroarrays</i> .....	- 52 -
<i>Tabelle 13: Fragmentierung, Markierung und Hybridisierung der DNA für Mikroarrays</i> .....	- 53 -
<i>Tabelle 14: Auswahl annotierte Gene und deren Assoziation mit kardialen Pathomechanismen im Herzen des mRenTG-Rattenmodell</i> .....	- 69 -
<i>Tabelle 15: IPA-Analyse der kardialen Genexpression in mRenTG- und ZSF1-Ratten</i> .....	- 69 -
<i>Tabelle 16: Auswahl annotierte Gene und deren Assoziation mit hepatischen Pathomechanismen in der Leber des ZSF1-Rattenmodell</i> .....	- 72 -
<i>Tabelle 17: IPA-Analyse der hepatischen Genexpression in ZSF1-Ratten</i> .....	- 72 -
<i>Tabelle 18: Auswahl annotierte Gene und deren Assoziation mit renalen Pathomechanismen in der Niere der ZSF1-, mRenTG, Glomerulonephritis- und AA Nephropathie-Rattenmodelle</i> .....	- 79 -

<i>Tabelle 19: IPA-Analyse der renalen Genexpression in ZSF1-Ratten</i> .....	- 81 -
<i>Tabelle 20: 12 ausgewählte miRNAs im Urin von ZSF1-Ratten nach EV-Anreicherung mit zwei EV-Isolationsmethoden</i> .....	- 92 -
<i>Tabelle 21: Relative Menge ausgewählter miRNAs im Nierengewebe von ZSF1-Ratten</i> .....	- 94 -
<i>Tabelle 22: Assoziation Ausgewählter miRNAs im Urin von ZSF1- und mRenTG-Ratten mit zentralen pathologischen Prozessen der CKD</i> .....	- 98 -
<i>Tabelle 23: Inverse Korrelation Ausgewählter miRNAs im Urin mit bekannten Ziel-mRNAs im Nierengewebe von ZSF1-Ratten</i> .....	- 101 -
<i>Anhang-Tabelle 24: Körpergewicht, Urinausscheidung und Proteingehalt und Kreatinin-gehalt im Urin des mRenTG-Rattenmodells</i> .....	LIV
<i>Anhang-Tabelle 25: Körpergewicht, Urinausscheidung und Proteingehalt und Kreatinin-gehalt im Urin des ZSF1-Rattenmodells</i> .....	LIV
<i>Anhang-Tabelle 26: Proteinbiomarker KIM1, OPN, CLU und CYSC im ZSF1-Tiermodell, sowie Kreatiningehalt des Urins für Normalisierung der Proteinbiomarker und miRNA</i> .....	LV
<i>Anhang-Tabelle 27: Anzahl signifikant deregulierter Gene in Herz, Niere und Leber im ZSF1- und mRenTG-Rattenmodell und in NTS- und AA-behandelten Ratten</i> .....	LV
<i>Anhang-Tabelle 28: Densitometrische Analyse des EV-Western Blots</i> .....	LVI
<i>Anhang-Tabelle 29: Verwendete Assays der Firma Qiagen für die in vitro und in vivo Quantifizierung von miRNAs</i> .....	LVI
<i>Anhang-Tabelle 30: Rohdaten des EV-miRNA-Profilings im Urin von ZSF1</i> .....	LXII
<i>Anhang-Tabelle 31: Ergebnisse des miRNA-Profilings in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle</i> .....	LXXII
<i>Anhang-Tabelle 32: Ergebnisse des miRNA-Profilings in 26 und 22 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zu 14 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten</i> .....	LXXXVII
<i>Anhang-Tabelle 33: Rohdaten der zweiten miRNA-Quantifizierung mit ausgewählten Assays im Urin von ZSF1-Ratten</i> .....	LXXXIX
<i>Anhang-Tabelle 34: Ergebnisse der zweiten miRNA-Quantifizierung ausgewählter miRNAs im Urin von ZSF1-Ratten</i> .....	LXXX
<i>Anhang-Tabelle 35: Rohdaten der miRNA-Quantifizierung im Nierengewebe von ZSF1-Ratten mittels qRT-PCR</i> .....	LXXX
<i>Anhang-Tabelle 36: Rohdaten der miRNA-Quantifizierung im Nierengewebe von ZSF1-Ratten mittels Nanostring</i> .....	LXXXI
<i>Anhang-Tabelle 37: Rohdaten der EV-miRNA Quantifizierung nach EV-Anreicherung mittels SEC, und vergleich zum Glomerulonephritis-Rattenmodell</i> .....	LXXXI
<i>Anhang-Tabelle 38: Ergebnisse der EV-miRNA Quantifizierung nach EV-Anreicherung mittels SEC, und vergleich zum Glomerulonephritis-Rattenmodell</i> .....	LXXXII
<i>Anhang-Tabelle 39: Rohdaten des miRNA-Profilings in mRenTG-Ratten</i> .....	LXXXII
<i>Anhang-Tabelle 40: Ergebnisse des miRNA-Profilings in mRenTG-Ratten</i> .....	LXXXVIII
<i>Anhang-Tabelle 41: miRNA-CLUSTERANALYSE VON 93 AUSGEWÄHLTEN MIRNAS MIT SIGNIFIKANTEN ÄNDERUNGEN IN HRPTECS IN VITRO UND IM URIN VON ZSF1-RATTEN IN VIVO</i> .....	LXXXVIII
<i>Anhang-Tabelle 42: IPA-BASIERTE miRNA-mRNA KORRELATIONSANALYSE</i> .....	XCI
<i>Anhang-Tabelle 43: ZYTOTOXIZITÄTS VON HRPTECS NACH BEHANDLUNG MIT TGF-B ODER HSA</i> .....	CII
<i>Anhang-Tabelle 44: ROHDATEN DER BESTIMMUNG DER GENEXPRESSION VON BEKANNTEN TGF-B ZIELGENEN IN HRPTECS NACH BEHANDLUNG MIT TGF-B</i> .....	CII

<i>Anhang-Tabelle 45: ROHDATEN DER BESTIMMUNG DER GENEXPRESSION VON BEKANNTEN HSA ZIELGENEN IN HRPTECS NACH BEHANDLUNG MIT HSA .....</i>	<i>CII</i>
<i>Anhang-Tabelle 46: Rohdaten des miRNA-Profilings in hRPTECs und Zellkulturmedium in vitro.....</i>	<i>CIII</i>
<i>Anhang-Tabelle 47: Ergebnisse des miRNA-Profilings in hRPTECs und Zellkulturmedium in vitro .....</i>	<i>CX</i>

## Literaturverzeichnis

- Abbasian N, Herbert KE, Pawluczyk I, Burton JO, Bevington A. 2018. Vesicles bearing gifts: The functional importance of micro-rna transfer in extracellular vesicles in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 315(5):F1430-f1443.
- Abuelo JG. 1990. Renal failure caused by chemicals, foods, plants, animal venoms, and misuse of drugs: An overview. *Archives of Internal Medicine.* 150(3):505-510.
- Advani A, Kelly DJ, Advani SL, Cox AJ, Thai K, Zhang Y, White KE, Gow RM, Marshall SM, Steer BM et al. 2007. Role of vegf in maintaining renal structure and function under normotensive and hypertensive conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(36):14448-14453.
- Ai K, Zhu X, Kang Y, Li H, Zhang L. 2020. Mir-130a-3p inhibition protects against renal fibrosis in vitro via the tgf- $\beta$ 1/smad pathway by targeting snon. *Exp Mol Pathol.* 112:104358.
- Al-Malki AL. 2014. Assessment of urinary osteopontin in association with podocyte for early predication of nephropathy in diabetic patients. *Disease Markers.* 2014:493736.
- Appelhoff RJ, Hill JV, Findon G, Frampton CM, Perry E, Ponnampereuma D, Endre ZH. 2010. Differential contribution of diabetes and the ren2 gene to glomerular pathology in diabetic (mren-2)27 rats. *Lab Invest.* 90(8):1225-1235.
- Arandjelovic S, Ravichandran KS. 2015. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol.* 16(9):907-917.
- Babelova A, Burckhardt BC, Salinas-Riester G, Pommerenke C, Burckhardt G, Henjakovic M. 2015a. Next generation sequencing of sex-specific genes in the livers of obese zsf1 rats. *Genomics.* 106(4):204-213.
- Babelova A, Burckhardt BC, Wegner W, Burckhardt G, Henjakovic M. 2015b. Sex-differences in renal expression of selected transporters and transcription factors in lean and obese zucker spontaneously hypertensive fatty rats. *J Diabetes Res.* 2015:483238.
- Baker MA, Davis SJ, Liu P, Pan X, Williams AM, Iczkowski KA, Gallagher ST, Bishop K, Regner KR, Liu Y et al. 2017. Tissue-specific microRNA expression patterns in four types of kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 28(10):2985-2992.
- Bartel DP. 2018. Metazoan microRNAs. *Cell.* 173(1):20-51.
- Barutta F, Tricarico M, Corbelli A, Annaratone L, Pinach S, Grimaldi S, Bruno G, Cimino D, Taverna D, Deregibus MC et al. 2013. Urinary exosomal microRNAs in incipient diabetic nephropathy. *PLoS One.* 8(11):e73798.
- Belete R, Ataro Z, Abdu A, Sheleme M. 2021. Global prevalence of metabolic syndrome among patients with type i diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome.* 13(1):25.
- Ben-Dov IZ, Whalen VM, Goilav B, Max KE, Tuschl T. 2016. Cell and microvesicle urine microRNA deep sequencing profiles from healthy individuals: Observations with potential impact on biomarker studies. *PLoS One.* 11(1):e0147249.
- Bernardi G. 2019. The genomic code: A pervasive encoding/molding of chromatin structures and a solution of the "non-coding DNA" mystery. *Bioessays.* 41(12):e1900106.
- Bielecka-Dabrowa A, Sakowicz A, Misztal M, von Haehling S, Ahmed A, Pietrucha T, Rysz J, Banach M. 2016. Differences in biochemical and genetic biomarkers in patients with heart failure of various etiologies. *International Journal of Cardiology.* 221:1073-1080.

- Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, Adebayo OM, Afarideh M, Agarwal SK, Agudelo-Botero M et al. 2020. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: A systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *The Lancet*. 395(10225):709-733.
- Bilan VP, Salah EM, Bastacky S, Jones HB, Mayers RM, Zinker B, Poucher SM, Tofovic SP. 2011. Diabetic nephropathy and long-term treatment effects of rosiglitazone and enalapril in obese zsf1 rats. *J Endocrinol*. 210(3):293-308.
- Binder C, Poglitsch M, Duca F, Rettl R, Dachs TM, Dalos D, Schrutka L, Seirer B, Ligios LC, Capelle C et al. 2021. Renin feedback is an independent predictor of outcome in hfpef. *J Pers Med*. 11(5).
- Bisping E, Ikeda S, Kong SW, Tarnavski O, Bodyak N, McMullen JR, Rajagopal S, Son JK, Ma Q, Springer Z et al. 2006. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(39):14471-14476.
- Bode D, Semmler L, Wakula P, Hegemann N, Primessnig U, Beindorff N, Powell D, Dahmen R, Ruetten H, Oeing C et al. 2021. Dual sglt-1 and sglt-2 inhibition improves left atrial dysfunction in hfpef. *Cardiovasc Diabetol*. 20(1):7.
- Bökenkamp A. 2020. Proteinuria—take a closer look! *Pediatric Nephrology*. 35(4):533-541.
- Bonventre JV, Vaidya VS, Schmouder R, Feig P, Dieterle F. 2010. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat Biotechnol*. 28(5):436-440.
- Borges Canha M, Portela-Cidade JP, Conceição G, Sousa-Mendes C, Leite S, Fontoura D, Moreira-Gonçalves D, Falcão-Pires I, Lourenço A, Leite-Moreira A et al. 2017. Characterization of liver changes in zsf1 rats, an animal model of metabolic syndrome. *Rev Esp Enferm Dig*. 109(7):491-497.
- Brandt MM, Nguyen ITN, Krebber MM, van de Wouw J, Mokry M, Cramer MJ, Duncker DJ, Verhaar MC, Joles JA, Cheng C. 2019. Limited synergy of obesity and hypertension, prevalent risk factors in onset and progression of heart failure with preserved ejection fraction. *J Cell Mol Med*. 23(10):6666-6678.
- Brosius FC, 3rd, Alpers CE, Bottinger EP, Breyer MD, Coffman TM, Gurley SB, Harris RC, Kakoki M, Kretzler M, Leiter EH et al. 2009. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 20(12):2503-2512.
- Diabetes mellitus typ 1 und typ 2. 2021. 28. Juni 2021. <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/diabetes.html>; [accessed 2021 17. Oktober 2021].
- Bunting KL, Melnick AM. 2013. New effector functions and regulatory mechanisms of bcl6 in normal and malignant lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*. 25(3):339-346.
- Burger D, Thibodeau JF, Holterman CE, Burns KD, Touyz RM, Kennedy CR. 2014. Urinary podocyte microparticles identify prealbuminuric diabetic glomerular injury. *J Am Soc Nephrol*. 25(7):1401-1407.
- Buschmann D, Kirchner B, Hermann S, Märte M, Wurmser C, Brandes F, Kotschote S, Bonin M, Steinlein OK, Pfaffl MW et al. 2018. Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling mirnas by next-generation sequencing. *J Extracell Vesicles*. 7(1):1481321.
- Bushel PR, Caiment F, Wu H, O'Lone R, Day F, Calley J, Smith A, Li J. 2018. Ratemirs: The rat atlas of tissue-specific and enriched mirnas database. *BMC Genomics*. 19(1):825.
- Byrne CD, Targher G. 2020. Nafld as a driver of chronic kidney disease. *J Hepatol*. 72(4):785-801.
- Cao JY, Wang B, Tang TT, Wen Y, Li ZL, Feng ST, Wu M, Liu D, Yin D, Ma KL et al. 2021. Exosomal mir-125b-5p deriving from mesenchymal stem cells promotes tubular repair by suppression of p53 in ischemic acute kidney injury. *Theranostics*. 11(11):5248-5266.
- Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. 2003. Low glomerular filtration rate in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: An indicator of more advanced glomerular lesions. *Diabetes*. 52(4):1036-1040.



- Carnino JM, Lee H, Jin Y. 2019. Isolation and characterization of extracellular vesicles from broncho-alveolar lavage fluid: A review and comparison of different methods. *Respiratory Research*. 20(1):240.
- Carroll EE, Ippolito DL, Permenter MG, McDyre BC, Baer CE, Kumsher DM, Boyle MH, DiVito VT, Lewis JA, Koontz JM. 2018. Utility of serum mir-122, liver enzymes, and hepatic histopathology in response to hepatotoxicants in sprague-dawley rats. *Toxicol Pathol*. 46(7):835-846.
- Castaneda TR, Mendez M, Davison I, Elvert R, Schwahn U, Boldina G, Rocher C, Scherer P, Singh K, Bangari DS et al. 2021. The novel phosphate and bile acid sequestrant polymer sar442357 delays disease progression in a rat model of diabetic nephropathy. *J Pharmacol Exp Ther*. 376(2):190-203.
- Leading causes of death and numbers of deaths, by age: United states, 1980 and 2018. 2018. <https://www.cdc.gov/nchs/data/hus/2019/007-508.pdf>; [accessed 2021 18. Oktober].
- Čertíková Chábová V, Kujal P, Vaňourková Z, Škaroupková P, Sadowski J, Kompanowska-Jezińska E, Tesař V, Hammock B, Imig J, Maxová H et al. 2019. Addition of endothelin a-receptor blockade spoils the beneficial effect of combined renin-angiotensin and soluble epoxide hydrolase inhibition: Studies on the course of chronic kidney disease in 5/6 nephrectomized ren-2 transgenic hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res*. 44(6):1493-1505.
- Chang H, Chang H, Cheng T, Lee GD, Chen X, Qi K. 2021. Micro-ribonucleic acid-23a-3p prevents the onset of type 2 diabetes mellitus by suppressing the activation of nucleotide-binding oligomerization-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammatory bodies-caused pyroptosis through negatively regulating nima-related kinase 7. *J Diabetes Investig*. 12(3):334-345.
- Chen B. 2019. The mirna-184 drives renal fibrosis by targeting hif1an in vitro and in vivo. *Int Urol Nephrol*. 51(3):543-550.
- Chen C, Jamaluddin MS, Yan S, Sheikh-Hamad D, Yao Q. 2008. Human stanniocalcin-1 blocks tnf-alpha-induced monolayer permeability in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28(5):906-912.
- Chen C, Lu C, Qian Y, Li H, Tan Y, Cai L, Weng H. 2017a. Urinary mir-21 as a potential biomarker of hypertensive kidney injury and fibrosis. *Sci Rep*. 7(1):17737.
- Chen CH, Dickman KG, Moriya M, Zavadil J, Sidorenko VS, Edwards KL, Gnatenko DV, Wu L, Turesky RJ, Wu XR et al. 2012a. Aristolochic acid-associated urothelial cancer in taiwan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(21):8241-8246.
- Chen D, Xiong X-Q, Zang Y-H, Tong Y, Zhou B, Chen Q, Li Y-H, Gao X-Y, Kang Y-M, Zhu G-Q. 2017b. Bcl6 attenuates renal inflammation via negative regulation of nlrp3 transcription. *Cell Death & Disease*. 8(10):e3156-e3156.
- Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. 2012b. Secreted micrnas: A new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 22(3):125-132.
- Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE et al. 2010. Mammalian micrnas: Experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*. 24(10):992-1009.
- Cho NJ, Kim DY, Kwon SH, Ha TW, Kim HK, Lee MR, Chun SW, Park S, Lee EY, Gil HW. 2021. Urinary exosomal micrna profiling in type 2 diabetes patients taking dipeptidyl peptidase-4 inhibitor compared with sulfonylurea. *Kidney Res Clin Pract*. 40(3):383-391.
- Chorley BN, Atabakhsh E, Doran G, Gautier JC, Ellinger-Ziegelbauer H, Jackson D, Sharapova T, Yuen PST, Church RJ, Couttet P et al. 2021a. Methodological considerations for measuring biofluid-based micrna biomarkers. *Crit Rev Toxicol*. 51(3):264-282.
- Chorley BN, Ellinger-Ziegelbauer H, Tackett M, Simutis FJ, Harrill AH, McDuffie J, Atabakhsh E, Nassirpour R, Whiteley LO, Leonard JF et al. 2021b. Urinary mirna biomarkers of drug-induced kidney injury and their site specificity within the nephron. *Toxicol Sci*. 180(1):1-16.

- Chowdhury MA, Moukarbel GV, Gupta R, Frank SM, Anderson AM, Liu LC, Khouri SJ. 2019. Endothelin 1 is associated with heart failure hospitalization and long-term mortality in patients with heart failure with preserved ejection fraction and pulmonary hypertension. *Cardiology*. 143(3-4):124-133.
- Church RJ, McDuffie JE, Sonee M, Otieno M, Ma JY, Liu X, Watkins PB, Harrill AH. 2014. MicroRNA-34c-3p is an early predictive biomarker for doxorubicin-induced glomerular injury progression in male sprague-dawley rats. *Toxicology Research*. 3(5):384-394.
- Connelly KA, Kelly DJ, Zhang Y, Prior DL, Martin J, Cox AJ, Thai K, Feneley MP, Tsoporis J, White KE et al. 2007. Functional, structural and molecular aspects of diastolic heart failure in the diabetic (mren-2)27 rat. *Cardiovasc Res*. 76(2):280-291.
- Conti M, Moutereau S, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Manivet P, Eschwège P, Loric S. 2006. Urinary cystatin c as a specific marker of tubular dysfunction. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 44(3):288-291.
- Cosyns J-P. 2003. Aristolochic acid and 'chinese herbs nephropathy'. *Drug Safety*. 26(1):33-48.
- Coughlan C, Bruce KD, Burgy O, Boyd TD, Michel CR, Garcia-Perez JE, Adame V, Anton P, Bettcher BM, Chial HJ et al. 2020. Exosome isolation by ultracentrifugation and precipitation and techniques for downstream analyses. *Curr Protoc Cell Biol*. 88(1):e110.
- Coughlan MT, Nguyen TV, Penfold SA, Higgins GC, Thallas-Bonke V, Tan SM, Van Bergen NJ, Sourris KC, Harcourt BE, Thorburn DR et al. 2016. Mapping time-course mitochondrial adaptations in the kidney in experimental diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 130(9):711-720.
- Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, Buzás EI, Lötvall J. 2013. Distinct rna profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles*. 2.
- Curthoys NP, Moe OW. 2014. Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 9(9):1627-1638.
- da Vinci L. 1515-1516. A sketch of the kidneys, ureters and bladder. Royal Collection Trust.
- Davila A, Tian Y, Czikora I, Li J, Su H, Huo Y, Patel V, Robinson V, Kapuku G, Weintraub N et al. 2019. Adenosine kinase inhibition augments conducted vasodilation and prevents left ventricle diastolic dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 12(8):e005762.
- De S, Kuwahara S, Hosojima M, Ishikawa T, Kaseda R, Sarkar P, Yoshioka Y, Kabasawa H, Iida T, Goto S et al. 2017. Exocytosis-mediated urinary full-length megalin excretion is linked with the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 66(5):1391-1404.
- Dower K, Zhao S, Schlerman FJ, Savary L, Campanholle G, Johnson BG, Xi L, Nguyen V, Zhan Y, Lech MP et al. 2017. High resolution molecular and histological analysis of renal disease progression in zsf1 fa/facp rats, a model of type 2 diabetic nephropathy. *PLoS One*. 12(7):e0181861.
- Du B, Jiang X, Das A, Zhou Q, Yu M, Jin R, Zheng J. 2017. Glomerular barrier behaves as an atomically precise bandpass filter in a sub-nanometre regime. *Nat Nanotechnol*. 12(11):1096-1102.
- Eissa S, Matboli M, Bekhet MM. 2016. Clinical verification of a novel urinary microRNA panel: 133b, -342 and -30 as biomarkers for diabetic nephropathy identified by bioinformatics analysis. *Biomed Pharmacother*. 83:92-99.
- Eknoyan G. 2000. Michelangelo: Art, anatomy, and the kidney. *Kidney Int*. 57(3):1190-1201.
- El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C, Alvarez-Erviti L, Sargent IL, Wood MJ. 2012. Exosome-mediated delivery of sirna in vitro and in vivo. *Nat Protoc*. 7(12):2112-2126.
- Eldh M, Lötvall J, Malmhäll C, Ekström K. 2012. Importance of rna isolation methods for analysis of exosomal rna: Evaluation of different methods. *Mol Immunol*. 50(4):278-286.
- Ennulat D, Adler S. 2015. Recent successes in the identification, development, and qualification of translational biomarkers: The next generation of kidney injury biomarkers. *Toxicol Pathol*. 43(1):62-69.

- Exrna research portal - protocols. 2021. <https://exrna.org/resources/protocols/>; [accessed 2021 30.10.].
- Erdbrügger U, Blijdorp CJ, Bijnsdorp IV, Borràs FE, Burger D, Bussolati B, Byrd JB, Clayton A, Dear JW, Falcón-Pérez JM et al. 2021. Urinary extracellular vesicles: A position paper by the urine task force of the international society for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 10(7):e12093.
- Erkan E, De Leon M, Devarajan P. 2001. Albumin overload induces apoptosis in llc-pk(1) cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 280(6):F1107-1114.
- FDA. 2018. Biomarker qualification determination. Available at: <https://www.fda.gov/media/115635/download>, Accessed July, 17 2021.
- Ferguson TW, Komenda P, Tangri N. 2015. Cystatin c as a biomarker for estimating glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 24(3):295-300.
- Ferré P, Fougelle F. 2010. Hepatic steatosis: A role for de novo lipogenesis and the transcription factor srebp-1c. *Diabetes Obes Metab*. 12 Suppl 2:83-92.
- Follmann M, Ackerstaff J, Redlich G, Wunder F, Lang D, Kern A, Fey P, Griebenow N, Kroh W, Becker-Pelster EM et al. 2017. Discovery of the soluble guanylate cyclase stimulator vericiguat (bay 1021189) for the treatment of chronic heart failure. *J Med Chem*. 60(12):5146-5161.
- Frangogiannis N. 2020. Transforming growth factor- $\beta$  in tissue fibrosis. *J Exp Med*. 217(3):e20190103.
- Franssen C, Chen S, Unger A, Korkmaz HI, De Keulenaer GW, Tschöpe C, Leite-Moreira AF, Musters R, Niessen HW, Linke WA et al. 2016. Myocardial microvascular inflammatory endothelial activation in heart failure with preserved ejection fraction. *JACC Heart Fail*. 4(4):312-324.
- Funk J, Ott V, Herrmann A, Rapp W, Raab S, Riboulet W, Vandjour A, Hainaut E, Benardeau A, Singer T et al. 2016. Semiautomated quantitative image analysis of glomerular immunohistochemistry markers desmin, vimentin, podocin, synaptopodin and wt-1 in acute and chronic rat kidney disease models. *Histochem Cell Biol*. 145(3):315-326.
- Galvan DL, Mise K, Danesh FR. 2021. Mitochondrial regulation of diabetic kidney disease. *Frontiers in Medicine*. 8.
- Gautier JC, Gury T, Guffroy M, Khan-Malek R, Hoffman D, Pettit S, Harpur E. 2014. Normal ranges and variability of novel urinary renal biomarkers in sprague-dawley rats: Comparison of constitutive values between males and females and across assay platforms. *Toxicol Pathol*. 42(7):1092-1104.
- GBD. 2016. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: A systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet*. 388(10053):1459-1544.
- Gezer U, Özgür E, Cetinkaya M, Isin M, Dalay N. 2014. Long non-coding rnas with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes. *Cell Biol Int*. 38(9):1076-1079.
- Ghai V, Wu X, Bheda-Malge A, Argyropoulos CP, Bernardo JF, Orchard T, Galas D, Wang K. 2018. Genome-wide profiling of urinary extracellular vesicle micrnas associated with diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Kidney Int Rep*. 3(3):555-572.
- Gholaminejad A, Abdul Tehrani H, Gholami Fesharaki M. 2018. Identification of candidate micrna biomarkers in diabetic nephropathy: A meta-analysis of profiling studies. *J Nephrol*. 31(6):813-831.
- Goethe JW. 1831. An carl friedrich zelter. Briefe.
- Gökmen MR, Cosyns JP, Arlt VM, Stiborová M, Phillips DH, Schmeiser HH, Simmonds MS, Cook HT, Vanherweghem JL, Nortier JL et al. 2013. The epidemiology, diagnosis, and management of aristolochic acid nephropathy: A narrative review. *Ann Intern Med*. 158(6):469-477.
- Gould SJ, Raposo G. 2013. As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2(1):20389.
- Grampp S, Goppelt-Struebe M. 2018. Receptor-independent modulation of tgf- $\beta$ -induced pro-fibrotic pathways by relaxin-2 in human primary tubular epithelial cells. *Cell and Tissue Research*. 374(3):619-627.

- Griffin KA, Abu-Naser M, Abu-Amarah I, Picken M, Williamson GA, Bidani AK. 2007. Dynamic blood pressure load and nephropathy in the *zsf1* (*fa/fa* cp) model of type 2 diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293(5):F1605-1613.
- Gu D, Chen Y, Masucci M, Xiong C, Zou H, Holthofer H. 2020. Potential urine biomarkers for the diagnosis of prediabetes and early diabetic nephropathy based on isn ckhdp program. *Clin Nephrol*.
- Guyton AC, Coleman TG. 1999. Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. 1969. *J Am Soc Nephrol*. 10(10):2248-2258.
- Guyton AC, Coleman TG, Granger HJ. 1972. Circulation: Overall regulation. *Annu Rev Physiol*. 34:13-46.
- Hamdani N, Franssen C, Lourenço A, Falcão-Pires I, Fontoura D, Leite S, Plettig L, López B, Ottenheijm CA, Becher PM et al. 2013. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail*. 6(6):1239-1249.
- Hamm LL, Nakhoul N, Hering-Smith KS. 2015. Acid-base homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 10(12):2232-2242.
- Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang B-T, Kim VN. 2006. Molecular basis for the recognition of primary micrnas by the drosha-dgcr8 complex. *Cell*. 125(5):887-901.
- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. 2002. Kidney injury molecule-1 (*kim-1*): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*. 62(1):237-244.
- Harbord N. 2011. Novel nephrotoxins. *Adv Chronic Kidney Dis*. 18(3):214-218.
- Harrison-Bernard LM. 2009. The renal renin-angiotensin system. *Advances in Physiology Education*. 33(4):270-274.
- Hassan M, Hatata EZ, Al-arman M, Aboelnaga MM. 2021. Urinary cystatin c as a biomarker of early renal dysfunction in type 2 diabetic patients. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 15(4):102152.
- Hathaway CK, Grant R, Hagaman JR, Hiller S, Li F, Xu L, Chang AS, Madden VJ, Bagnell CR, Rojas M et al. 2015. Endothelin-1 critically influences cardiac function via superoxide-mmp9 cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(16):5141-5146.
- Hayakawa H, Coffee K, Raij L. 1997. Endothelial dysfunction and cardiorenal injury in experimental salt-sensitive hypertension: Effects of antihypertensive therapy. *Circulation*. 96(7):2407-2413.
- Hayden MR, Chowdhury N, Govindarajan G, Karuparthi PR, Habibi J, Sowers JR. 2006. Myocardial myocyte remodeling and fibrosis in the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr*. 1(5):326-333.
- Heiss C, Rodriguez-Mateos A, Kelm M. 2015. Central role of enos in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxid Redox Signal*. 22(14):1230-1242.
- Herichová I, Mravec B, Stebelová K, Křižanová Og, Jurkovičová D, Kvetňanský R, Zeman M. 2007. Rhythmic clock gene expression in heart, kidney and some brain nuclei involved in blood pressure control in hypertensive *tgr(mren-2)27* rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 296(1):25-34.
- Heyen JRR, Blasi ER, Nikula K, Rocha R, Daust HA, Friedrich G, Vleet JFV, Ciechi PD, McMahon EG, Rudolph AE. 2002. Structural, functional, and molecular characterization of the *shhf* model of heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 283(5):H1775-H1784.
- Hills CE, Al-Rasheed N, Al-Rasheed N, Willars GB, Brunskill NJ. 2009. C-peptide reverses *tgf-beta1*-induced changes in renal proximal tubular cells: Implications for treatment of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 296(3):F614-621.
- Hirth-Dietrich C, Stasch JP, Ganten D, Luft FC. 1994. Renal effects of captopril and nitrendipine in transgenic rats with an extra renin gene. *Hypertension*. 23(5):626-631.
- Ho J, Ng KH, Rosen S, Dostal A, Gregory RI, Kreidberg JA. 2008. Podocyte-specific loss of functional micrnas leads to rapid glomerular and tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 19(11):2069-2075.

- Homer BL, Dower K. 2018. 41-week study of progressive diabetic nephropathy in the *zsf1 fa/fa(cp)* rat model. *Toxicol Pathol.* 46(8):976-977.
- Huang L, Belousova T, Pan JS, Du J, Ju H, Lu L, Zhang P, Truong LD, Nuotio-Antar A, Sheikh-Hamad D. 2014. Aki after conditional and kidney-specific knockdown of stanniocalcin-1. *J Am Soc Nephrol.* 25(10):2303-2315.
- Huang L, Lou Y, Ju H, Zhang L, Pan JS, Ross A, Sun Y, Truong LD, Sheikh-Hamad D. 2015. Severe nephrotoxic nephritis following conditional and kidney-specific knockdown of stanniocalcin-1. *PLoS One.* 10(9):e0138440.
- Huang PL. 2009. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2(5-6):231-237.
- Huang YF, Zhang Y, Liu CX, Huang J, Ding GH. 2016. MicroRNA-125b contributes to high glucose-induced reactive oxygen species generation and apoptosis in hk-2 renal tubular epithelial cells by targeting angiotensin-converting enzyme 2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 20(19):4055-4062.
- Hudkins KL, Giachelli CM, Cui Y, Couser WG, Johnson RJ, Alpers CE. 1999. Osteopontin expression in fetal and mature human kidney. *J Am Soc Nephrol.* 10(3):444-457.
- Hye Khan MA, Kolb L, Skibba M, Hartmann M, Blöcher R, Proschak E, Imig JD. 2018. A novel dual ppar- $\gamma$  agonist/seh inhibitor treats diabetic complications in a rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 61(10):2235-2246.
- Idf diabetes atlas, 9th edition 2019. 2019. <https://diabetesatlas.org/en/>; [accessed 2021 18. Oktober].
- Iraci N, Gaude E, Leonardi T, Costa ASH, Cossetti C, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, Saini HK, Gelati M, Vescovi AL et al. 2017. Extracellular vesicles are independent metabolic units with asparaginase activity. *Nature Chemical Biology.* 13(9):951-955.
- Ishii H, Kaneko S, Yanai K, Aomatsu A, Hirai K, Ookawara S, Morishita Y. 2021. MicroRNA expression profiling in diabetic kidney disease. *Translational Research.* 237:31-52.
- Iwanaga Y, Kihara Y, Takenaka H, Kita T. 2006. Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: Possible role of angiotensin ii-angiotensin type 1 receptor system. *J Mol Cell Cardiol.* 41(5):798-806.
- Jennings P, Weiland C, Limonciel A, Bloch KM, Radford R, Aschauer L, McMorrow T, Wilmes A, Pfaller W, Ahr HJ et al. 2012. Transcriptomic alterations induced by ochratoxin a in rat and human renal proximal tubular in vitro models and comparison to a rat in vivo model. *Arch Toxicol.* 86(4):571-589.
- Jeon JS, Kim E, Bae YU, Yang WM, Lee H, Kim H, Noh H, Han DC, Ryu S, Kwon SH. 2020. MicroRNA in extracellular vesicles released by damaged podocytes promote apoptosis of renal tubular epithelial cells. *Cells.* 9(6).
- Jia G, Aroor AR, Hill MA, Sowers JR. 2018. Role of renin-angiotensin-aldosterone system activation in promoting cardiovascular fibrosis and stiffness. *Hypertension.* 72(3):537-548.
- Jia Q, Wang D. 2022. [effect of bdnf-as/mir-145-5p axis on renal tubular epithelial cell injury induced by high glucose]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 39(2):157-160.
- Jing H, Tang S, Lin S, Liao M, Chen H, Zhou J. 2019. The role of extracellular vesicles in renal fibrosis. *Cell Death Dis.* 10(5):367.
- Johnson MS, DeMarco VG, Heesch CM, Whaley-Connell AT, Schneider RI, Rehmer NT, Tilmon RD, Ferrario CM, Sowers JR. 2011. Sex differences in baroreflex sensitivity, heart rate variability, and end organ damage in the *tgr(mren2)27* rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301(4):H1540-1550.
- Kang E, Han SS, Kim J, Park SK, Chung W, Oh YK, Chae D-W, Kim Y-S, Ahn C, Oh K-H. 2020. Discrepant glomerular filtration rate trends from creatinine and cystatin c in patients with chronic kidney disease: Results from the know-ckd cohort. *BMC Nephrology.* 21(1):280.
- Kapoula GV, Kontou PI, Bagos PG. 2020. Diagnostic performance of biomarkers urinary kim-1 and ykl-40 for early diabetic nephropathy, in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diagnostics (Basel).* 10(11).

- Karanović S, Ardin M, Tang Z, Tomić K, Villar S, Renard C, Venturini E, Lorch AH, Lee DS, Stipančić Ž et al. 2021. Molecular profiles and urinary biomarkers of upper tract urothelial carcinomas associated with aristolochic acid exposure. *Int J Cancer*.
- Karanović S, Ardin M, Tang Z, Tomić K, Villar S, Renard C, Venturini E, Lorch AH, Lee DS, Stipančić Ž et al. 2022. Molecular profiles and urinary biomarkers of upper tract urothelial carcinomas associated with aristolochic acid exposure. *Int J Cancer*. 150(2):374-386.
- Karttunen J, Heiskanen M, Navarro-Ferrandis V, Das Gupta S, Lipponen A, Puhakka N, Rilla K, Koistinen A, Pitkänen A. 2019. Precipitation-based extracellular vesicle isolation from rat plasma co-precipitate vesicle-free micrnas. *J Extracell Vesicles*. 8(1):1555410.
- Kawasaki Y. 2011. Mechanism of onset and exacerbation of chronic glomerulonephritis and its treatment. *Pediatrics International*. 53(6):795-806.
- Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders H-J. 2021. Acute kidney injury. *Nature Reviews Disease Primers*. 7(1):52.
- Kelly DJ, Buck D, Cox AJ, Zhang Y, Gilbert RE. 2007. Effects on protein kinase c-beta inhibition on glomerular vascular endothelial growth factor expression and endothelial cells in advanced experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293(2):F565-574.
- Khan FA, Fatima SS, Khan GM, Shahid S. 2019. Evaluation of kidney injury molecule-1 as a disease progression biomarker in diabetic nephropathy. *Pak J Med Sci*. 35(4):992-996.
- Khan TM, Khan KN. 2015. Acute kidney injury and chronic kidney disease. *Vet Pathol*. 52(3):441-444.
- Kim SS, Song SH, Kim JH, Jeon YK, Kim BH, Kang MC, Chun SW, Hong SH, Chung M, Kim YK et al. 2017. Urine clusterin/apolipoprotein j is linked to tubular damage and renal outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 87(2):156-164.
- Kloten V, Neumann MHD, Di Pasquale F, Sprenger-Haussels M, Shaffer JM, Schlumpberger M, Herdean A, Betsou F, Ammerlaan W, Af Hällström T et al. 2019. Multicenter evaluation of circulating plasma microrna extraction technologies for the development of clinically feasible reverse transcription quantitative pcr and next-generation sequencing analytical work flows. *Clin Chem*. 65(9):1132-1140.
- Kolkhof P, Hartmann E, Freyberger A, Pavkovic M, Mathar I, Sandner P, Droebner K, Joseph A, Hüser J, Eitner F. 2021. Effects of finerenone combined with empagliflozin in a model of hypertension-induced end-organ damage. *Am J Nephrol*. 1-11.
- Kovács Á, Fülöp GÁ, Kovács A, Csípő T, Bódi B, Priksz D, Juhász B, Beke L, Hendrik Z, Méhes G et al. 2016. Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mren2 rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 310(11):H1671-H1682.
- Kubota N, Kubota T, Kajiwara E, Iwamura T, Kumagai H, Watanabe T, Inoue M, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K et al. 2016. Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity. *Nature Communications*. 7(1):12977.
- Kurt B, Kurtz A. 2015. Plasticity of renal endocrine function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 308(6):R455-466.
- Kwon SH, Woollard JR, Saad A, Garovic VD, Zand L, Jordan KL, Textor SC, Lerman LO. 2017. Elevated urinary podocyte-derived extracellular microvesicles in renovascular hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant*. 32(5):800-807.
- Langfelder P, Horvath S. 2007. Eigengene networks for studying the relationships between co-expression modules. *BMC Syst Biol*. 1:54.
- Lebeau C, Arlt VM, Schmeiser HH, Boom A, Verroust PJ, Devuyst O, Beauwens R. 2001. Aristolochic acid impedes endocytosis and induces DNA adducts in proximal tubule cells. *Kidney Int*. 60(4):1332-1342.
- Lebeau C, Debelle FD, Arlt VM, Pozdzik A, De Prez EG, Phillips DH, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem J-L, Nortier JL. 2005. Early proximal tubule injury in

- experimental aristolochic acid nephropathy: Functional and histological studies. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 20(11):2321-2332.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5):843-854.
- Leite S, Cerqueira RJ, Ibarrola J, Fontoura D, Fernández-Celis A, Zannad F, Falcão-Pires I, Paulus WJ, Leite-Moreira AF, Rossignol P et al. 2019. Arterial remodeling and dysfunction in the *zsf1* rat model of heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 12(7):e005596.
- Lemley KV. 2007. An introduction to biomarkers: Applications to chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 22(11):1849-1859.
- Lemley KV. 2016. Glomerular pathology and the progression of chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 310(11):F1385-F1388.
- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. 2002. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 360(9349):1903-1913.
- Li J, Han X, Wan Y, Zhang S, Zhao Y, Fan R, Cui Q, Zhou Y. 2018a. Tam 2.0: Tool for microrna set analysis. *Nucleic Acids Res*. 46(W1):W180-w185.
- Li JB, Wang HY, Yao Y, Sun QF, Liu ZH, Liu SQ, Zhuang JL, Wang YP, Liu HY. 2017. Overexpression of microrna-138 alleviates human coronary artery endothelial cell injury and inflammatory response by inhibiting the pi3k/akt/enos pathway. *J Cell Mol Med*. 21(8):1482-1491.
- Li Q, Youn JY, Cai H. 2015a. Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *J Hypertens*. 33(6):1128-1136.
- Li S-p, Lin Z-x, Jiang X-y, Yu X-y. 2018b. Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools. *Acta Pharmacologica Sinica*. 39(4):542-551.
- Li SC, Chan WC, Hu LY, Lai CH, Hsu CN, Lin WC. 2010. Identification of homologous micrnas in 56 animal genomes. *Genomics*. 96(1):1-9.
- Li X, Yang L, Yu Y. 2001. [an analysis of the clinical and pathological characteristics of mutong (a chinese herb) induced tubulointerstitial nephropathy]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 40(10):681-687.
- Li Z, Qin T, Wang K, Hackenberg M, Yan J, Gao Y, Yu LR, Shi L, Su Z, Chen T. 2015b. Integrated microrna, mrna, and protein expression profiling reveals microrna regulatory networks in rat kidney treated with a carcinogenic dose of aristolochic acid. *BMC Genomics*. 16(1):365.
- Liang W, Menke AL, Driessen A, Koek GH, Lindeman JH, Stoop R, Havekes LM, Kleemann R, van den Hoek AM. 2014. Establishment of a general nafld scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS One*. 9(12):e115922.
- Liang W, Sun F, Zhao Y, Shan L, Lou H. 2020. Identification of susceptibility modules and genes for cardiovascular disease in diabetic patients using wgcn analysis. *J Diabetes Res*. 2020:4178639.
- Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F, Dal Canton A. 2011. Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis. *Clin Biochem*. 44(14-15):1189-1198.
- Lin T-Y, Cantley L, DeNicola G. 2016. Nrf2 rewires cellular metabolism to support the antioxidant response.
- Linden KC, DeHaan CL, Zhang Y, Glowacka S, Cox AJ, Kelly DJ, Rogers S. 2006. Renal expression and localization of the facilitative glucose transporters *glut1* and *glut12* in animal models of hypertension and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290(1):F205-213.
- Liu B, Qiang L, Wang GD, Duan Q, Liu J. 2019a. Lncrna *malat1* facilitates high glucose induced endothelial to mesenchymal transition and fibrosis via targeting *mir-145/zeb2* axis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 23(8):3478-3486.
- Liu P, Zhang B, Chen Z, He Y, Du Y, Liu Y, Chen X. 2020a. M(6)a-induced lncrna *malat1* aggravates renal fibrogenesis in obstructive nephropathy through the *mir-145/fak* pathway. *Aging (Albany NY)*. 12(6):5280-5299.

- Liu X, Miao J, Wang C, Zhou S, Chen S, Ren Q, Hong X, Wang Y, Hou FF, Zhou L et al. 2019b. Tubule-derived exosomes play a central role in fibroblast activation and kidney fibrosis. *Kidney Int.*
- Liu X, Miao J, Wang C, Zhou S, Chen S, Ren Q, Hong X, Wang Y, Hou FF, Zhou L et al. 2020b. Tubule-derived exosomes play a central role in fibroblast activation and kidney fibrosis. *Kidney Int.* 97(6):1181-1195.
- Lorenzen J, Shah R, Biser A, Staicu SA, Niranjan T, Garcia AM, Gruenwald A, Thomas DB, Shatat IF, Supe K et al. 2008. The role of osteopontin in the development of albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 19(5):884-890.
- Loria P, Lonardo A, Leonardi F, Fontana C, Carulli L, Verrone A, Borsatti A, Bertolotti M, Cassani F, Bagni A et al. 2003. Non-organ-specific autoantibodies in nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and correlates. *Digestive diseases and sciences.* 48:2173-2181.
- Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T et al. 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med.* 21(9):998-1009.
- Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R. 2016. Partial epithelial-to-mesenchymal transition and other new mechanisms of kidney fibrosis. *Trends Endocrinol Metab.* 27(10):681-695.
- Luciano RL, Perazella MA. 2015. Aristolochic acid nephropathy: Epidemiology, clinical presentation, and treatment. *Drug Saf.* 38(1):55-64.
- Ludwig N, Whiteside TL, Reichert TE. 2019. Challenges in exosome isolation and analysis in health and disease. *Int J Mol Sci.* 20(19).
- Luyckx VA, Tuttle KR, Garcia-Garcia G, Gharbi MB, Heerspink HJL, Johnson DW, Liu ZH, Massy ZA, Moe O, Nelson RG et al. 2017. Reducing major risk factors for chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl (2011).* 7(2):71-87.
- Lv JC, Zhang LX. 2019. Prevalence and disease burden of chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol.* 1165:3-15.
- Lv LL, Cao Y, Liu D, Xu M, Liu H, Tang RN, Ma KL, Liu BC. 2013. Isolation and quantification of micrnas from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. *Int J Biol Sci.* 9(10):1021-1031.
- Lv LL, Feng Y, Tang TT, Liu BC. 2019. New insight into the role of extracellular vesicles in kidney disease. *J Cell Mol Med.* 23(2):731-739.
- Lyle AN, Joseph G, Fan AE, Weiss D, Landázuri N, Taylor WR. 2012. Reactive oxygen species regulate osteopontin expression in a murine model of postischemic neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(6):1383-1391.
- Macisaac RJ, Jerums G. 2011. Diabetic kidney disease with and without albuminuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 20(3):246-257.
- Makris K, Spanou L. 2016. Acute kidney injury: Definition, pathophysiology and clinical phenotypes. *Clin Biochem Rev.* 37(2):85-98.
- Manaf MRA, Nawi AM, Tauhid NM, Othman H, Rahman MRA, Yusoff HM, Safian N, Ng PY, Manaf ZA, Kadir NByA et al. 2021. Prevalence of metabolic syndrome and its associated risk factors among staffs in a malaysian public university. *Scientific Reports.* 11(1):8132.
- Mantovani A, Ballestri S, Lonardo A, Targher G. 2016. Cardiovascular disease and myocardial abnormalities in nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences.* 61.
- Matovinović MS. 2009. 1. Pathophysiology and classification of kidney diseases. *Ejifcc.* 20(1):2-11.
- Matthews O, Morrison EE, Tranter JD, Starkey Lewis P, Toor IS, Srivastava A, Sargeant R, Rollison H, Matchett KP, Kendall TJ et al. 2020. Transfer of hepatocellular microrna regulates cytochrome p450 2e1 in renal tubular cells. *EBioMedicine.* 62:103092.
- Medeiros T, Myette RL, Almeida JR, Silva AA, Burger D. 2020. Extracellular vesicles: Cell-derived biomarkers of glomerular and tubular injury. *Cell Physiol Biochem.* 54(1):88-109.



- Mendrick DL, Diehl AM, Topor LS, Dietert RR, Will Y, La Merrill MA, Bouret S, Varma V, Hastings KL, Schug TT et al. 2018. Metabolic syndrome and associated diseases: From the bench to the clinic. *Toxicol Sci.* 162(1):36-42.
- Meng F, Li Z, Yan J, Manjanatha M, Shelton S, Yarborough S, Chen T. 2014. Tissue-specific microRNA responses in rats treated with mutagenic and carcinogenic doses of aristolochic acid. *Mutagenesis.* 29(5):357-365.
- Meng X-m, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. 2016. Tgf- $\beta$ : The master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology.* 12(6):325-338.
- Meng XM. 2019. Inflammatory mediators and renal fibrosis. *Adv Exp Med Biol.* 1165:381-406.
- Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. 2009. A novel and universal method for microRNA rt-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 10(6):R64.
- Meyer SU, Kaiser S, Wagner C, Thirion C, Pfaffl MW. 2012. Profound effect of profiling platform and normalization strategy on detection of differentially expressed microRNAs—a comparative study. *PLoS One.* 7(6):e38946.
- Mifsud SA, Burrell LM, Kubota E, Jaworski K, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL. 2004. Cardiorenal protective effects of vasopeptidase inhibition with omapatrilat in hypertensive transgenic (mren-2)27 rats. *Clinical and Experimental Hypertension.* 26(1):69-80.
- Mills KT, Stefanescu A, He J. 2020. The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol.* 16(4):223-237.
- Miranda-Silva D, Wüst RCI, Conceição G, Gonçalves-Rodrigues P, Gonçalves N, Gonçalves A, Kuster DWD, Leite-Moreira AF, van der Velden J, de Sousa Beleza JM et al. 2020. Disturbed cardiac mitochondrial and cytosolic calcium handling in a metabolic risk-related rat model of heart failure with preserved ejection fraction. *Acta Physiol (Oxf).* 228(3):e13378.
- Miranda KC, Bond DT, Levin JZ, Adiconis X, Sivachenko A, Russ C, Brown D, Nusbaum C, Russo LM. 2014. Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. *PLoS One.* 9(5):e96094.
- Miranda KC, Bond DT, McKee M, Skog J, Păunescu TG, Da Silva N, Brown D, Russo LM. 2010. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int.* 78(2):191-199.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A et al. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(30):10513-10518.
- Mohan A, Singh RS, Kumari M, Garg D, Upadhyay A, Ecelbarger CM, Tripathy S, Tiwari S. 2016. Urinary exosomal microRNA-451-5p is a potential early biomarker of diabetic nephropathy in rats. *PLoS one.* 11(4):e0154055-e0154055.
- Mohandas R, Douma LG, Scindia Y, Gumz ML. 2022. Circadian rhythms and renal pathophysiology. *J Clin Invest.* 132(3).
- Molitch ME, Steffes M, Sun W, Rutledge B, Cleary P, de Boer IH, Zinman B, Lachin J. 2010. Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care.* 33(7):1536-1543.
- Mongiuió-Tortajada M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A, Roura S, Borràs FE. 2019. Extracellular vesicle isolation methods: Rising impact of size-exclusion chromatography. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 76(12):2369-2382.
- Moon S, Shin DW, Kim S, Lee YS, Mankhong S, Yang SW, Lee PH, Park DH, Kwak HB, Lee JS et al. 2019. Enrichment of exosome-like extracellular vesicles from plasma suitable for clinical vesicular miRNA biomarker research. *J Clin Med.* 8(11).

- Motosugi Y, Ando H, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa E, Kumazaki M, Fujimura A. 2011. Tissue-dependent alterations of the clock gene expression rhythms in leptin-resistant zucker diabetic fatty rats. *Chronobiology International*. 28(10):968-972.
- Motoyoshi Y, Matsusaka T, Saito A, Pastan I, Willnow TE, Mizutani S, Ichikawa I. 2008. Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney International*. 74(10):1262-1269.
- Mukherjee DP, McTiernan CF, Sen S. 1993. Myotrophin induces early response genes and enhances cardiac gene expression. *Hypertension*. 21(2):142-148.
- Müller-Deile J, Dannenberg J, Liu P, Lorenzen J, Nyström J, Thum T, Schiffer M. 2019. Identification of cell and disease specific micrnas in glomerular pathologies. *J Cell Mol Med*. 23(6):3927-3939.
- Mullins JJ, Peters J, Ganten D. 1990. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse ren-2 gene. *Nature*. 344(6266):541-544.
- Mussack V, Wittmann G, Pfaffl MW. 2019. Comparing small urinary extracellular vesicle purification methods with a view to rna sequencing—enabling robust and non-invasive biomarker research. *Biomolecular Detection and Quantification*. 17:100089.
- Nakayama T, Sato W, Kosugi T, Zhang L, Campbell-Thompson M, Yoshimura A, Croker BP, Johnson RJ, Nakagawa T. 2009. Endothelial injury due to enos deficiency accelerates the progression of chronic renal disease in the mouse. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 296(2):F317-F327.
- NCD Risk Factor Collaboration. 2021. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: A pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet*. 398(10304):957-980.
- Nguyen ITN, Brandt MM, van de Wouw J, van Drie RWA, Wesseling M, Cramer MJ, de Jager SCA, Merkus D, Duncker DJ, Cheng C et al. 2020. Both male and female obese zsf1 rats develop cardiac dysfunction in obesity-induced heart failure with preserved ejection fraction. *PLoS One*. 15(5):e0232399.
- Nicholson RJ, Pezzolesi MG, Summers SA. 2021. Rotten to the cortex: Ceramide-mediated lipotoxicity in diabetic kidney disease. *Frontiers in Endocrinology*. 11(1096).
- Nigam SK, Wu W, Bush KT, Hoenig MP, Blantz RC, Bhatnagar V. 2015. Handling of drugs, metabolites, and uremic toxins by kidney proximal tubule drug transporters. *Clin J Am Soc Nephrol*. 10(11):2039-2049.
- Nishimura H, Sanaka T, Nihei H, Nishikawa M, Aikawa E. 1996. Mechanism of elevated local oxidant stress in early anti-glomerular basement membrane nephritis: An evaluation of oxidant production and superoxide dismutase expression. *日本腎臓学会誌*. 38(10):441-448.
- Noon AP, Vlatković N, Polański R, Maguire M, Shawki H, Parsons K, Boyd MT. 2010. P53 and mdm2 in renal cell carcinoma: Biomarkers for disease progression and future therapeutic targets? *Cancer*. 116(4):780-790.
- Nortier JL, Martinez M-CM, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, Depierreux MF, De Pauw L, Abramowicz D, Vereerstraeten P et al. 2000. Urothelial carcinoma associated with the use of a chinese herb (aristolochia fangchi). *New England Journal of Medicine*. 342(23):1686-1692.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. 2018. Overview of microrna biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9:402.
- Olaoye OA, Masten SH, Mohandas R, Gumz ML. 2019. Circadian clock genes in diabetic kidney disease (dkd). *Current Diabetes Reports*. 19(7):42.
- Pamphlett R, Doble PA, Bishop DP. 2021. The prevalence of inorganic mercury in human kidneys suggests a role for toxic metals in essential hypertension. *Toxics*. 9(3).
- Panduru NM, Sandholm N, Forsblom C, Saraheimo M, Dahlström EH, Thorn LM, Gordin D, Tolonen N, Wadén J, Harjutsalo V et al. 2015. Kidney injury molecule-1 and the loss of kidney function in diabetic nephropathy: A likely causal link in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 38(6):1130-1137.
- Paschos P, Paletas K. 2009. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*. 13(1):9-19.

- Pavkovic M, Riefke B, Ellinger-Ziegelbauer H. 2014. Urinary microRNA profiling for identification of biomarkers after cisplatin-induced kidney injury. *Toxicology*. 324:147-157.
- Pavkovic M, Riefke B, Frisk AL, Gröticke I, Ellinger-Ziegelbauer H. 2015a. Glomerulonephritis-induced changes in kidney gene expression in rats. *Genom Data*. 6:81-82.
- Pavkovic M, Riefke B, Frisk AL, Gröticke I, Ellinger-Ziegelbauer H. 2015b. Glomerulonephritis-induced changes in urinary and kidney microRNA profiles in rats. *Toxicol Sci*. 145(2):348-359.
- Pazourkova E, Pospisilova S, Svobodova I, Horinek A, Brisuda A, Soukup V, Hrbacek J, Capoun O, Mares J, Hanus T et al. 2016. Comparison of microRNA content in plasma and urine indicates the existence of a transrenal passage of selected microRNAs. *Adv Exp Med Biol*. 924:97-100.
- Pchejetski D, Foussal C, Alfarano C, Lairez O, Calise D, Guilbeau-Frugier C, Schaak S, Seguelas MH, Wanecq E, Valet P et al. 2012. Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur Heart J*. 33(18):2360-2369.
- Peng C, Wang J, Bao Q, Wang J, Liu Z, Wen J, Zhang W, Shen Y. 2020. Isolation of extracellular vesicle with different precipitation-based methods exerts a tremendous impact on the biomarker analysis for clinical plasma samples. *Cancer Biomarkers*. 29:373-385.
- Pozdzik AA, Salmon IJ, Debelle FD, Decaestecker C, Van den Branden C, Verbeelen D, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem JL, Nortier JL. 2008. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int*. 73(5):595-607.
- Prabhakar S, Starnes J, Shi S, Lonis B, Tran R. 2007. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. *J Am Soc Nephrol*. 18(11):2945-2952.
- Pradervand S, Zuber Mercier A, Centeno G, Bonny O, Firsov D. 2010. A comprehensive analysis of gene expression profiles in distal parts of the mouse renal tubule. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 460(6):925-952.
- Prosdocimo DA, John JE, Zhang L, Efraim ES, Zhang R, Liao X, Jain MK. 2015. Klf15 and ppar $\alpha$  cooperate to regulate cardiomyocyte lipid gene expression and oxidation. *PPAR Res*. 2015:201625.
- Purkerson ML, Wechsler L. 1997. Depictions of the kidney through the ages. *Am J Nephrol*. 17(3-4):340-346.
- Pusey CD. 2003. Anti-glomerular basement membrane disease. *Kidney Int*. 64(4):1535-1550.
- Qi W, Chen X, Polhill TS, Sumual S, Twigg S, Gilbert RE, Pollock CA. 2006. Tgf- $\beta$ 1 induces il-8 and mcp-1 through a connective tissue growth factor-independent pathway. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 290(3):F703-F709.
- Qian Q. 2017. Inflammation: A key contributor to the genesis and progression of chronic kidney disease. *Contrib Nephrol*. 191:72-83.
- Qu Y, Zhang Q, Cai X, Li F, Ma Z, Xu M, Lu L. 2017. Exosomes derived from mir-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation. *J Cell Mol Med*. 21(10):2491-2502.
- Quiñones M, Fernø J, Al-Massadi O. 2020. Ghrelin and liver disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 21(1):45-56.
- Radi ZA. 2019. Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. *Int J Toxicol*. 38(3):215-227.
- Rafikova O, Salah EM, Tofovic SP. 2008. Renal and metabolic effects of tempol in obese zsf1 rats--distinct role for superoxide and hydrogen peroxide in diabetic renal injury. *Metabolism*. 57(10):1434-1444.
- Raina R, Chauvin A, Chakraborty R, Nair N, Shah H, Krishnappa V, Kusumi K. 2020. The role of endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Diseases*. 6(1):22-34.

- Reaven GM. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37(12):1595-1607.
- Rigalli JP, Barros ER, Sommers V, Bindels RJM, Hoenderop JGJ. 2020. Novel aspects of extracellular vesicles in the regulation of renal physiological and pathophysiological processes. *Front Cell Dev Biol*. 8:244.
- Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, Massy Z, Wanner C, Anders H-J. 2017. Chronic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 3(1):17088.
- Ruggiero C, Elks CM, Kruger C, Cleland E, Addison K, Noland RC, Stadler K. 2014. Albumin-bound fatty acids but not albumin itself alter redox balance in tubular epithelial cells and induce a peroxide-mediated redox-sensitive apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 306(8):F896-906.
- Russo F, Di Bella S, Vannini F, Berti G, Scoyni F, Cook HV, Santos A, Nigita G, Bonnici V, Laganà A et al. 2018. Mirandola 2017: A curated knowledge base of non-invasive biomarkers. *Nucleic Acids Research*. 46(D1):D354-D359.
- Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. 2015. Leptin resistance and diet-induced obesity: Central and peripheral actions of leptin. *Metabolism*. 64(1):35-46.
- Salah EM, Bastacky SI, Jackson EK, Tofovic SP. 2018. Captopril attenuates cardiovascular and renal disease in a rat model of heart failure with preserved ejection fraction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 71(4):205-214.
- Salatto CT, Miller RA, Cameron KO, Cokorinos E, Reyes A, Ward J, Calabrese MF, Kurumbail RG, Rajamohan F, Kalgutkar AS et al. 2017. Selective activation of ampk  $\beta$ 1-containing isoforms improves kidney function in a rat model of diabetic nephropathy. *J Pharmacol Exp Ther*. 361(2):303-311.
- Salmon AH, Neal CR, Harper SJ. 2009. New aspects of glomerular filtration barrier structure and function: Five layers (at least) not three. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 18(3):197-205.
- Sarafidis PA, Nilsson PM. 2006. The metabolic syndrome: A glance at its history. *J Hypertens*. 24(4):621-626.
- Schieber M, Chandel NS. 2014. Ros function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 24(10):R453-462.
- Schulz W, Brass H. 2017. Beiträge zur geschichte der nephrologie. Dusterl-Verglag Dr. Karl Feistle GmbH & Co. KG.
- Seyahian EA, Cacciagiu L, Damiano AE, Zotta E. 2020. Aqp1 expression in the proximal tubule of diabetic rat kidney. *Heliyon*. 6(1):e03192.
- Shabaka A, Cases-Corona C, Fernandez-Juarez G. 2021. Therapeutic insights in chronic kidney disease progression. *Front Med (Lausanne)*. 8:645187.
- Sharif MN, Campanholle G, Nagiec EE, Wang J, Syed J, O'Neil SP, Zhan Y, Breneman K, Homer B, Neubert H et al. 2016. Soluble fn14 is detected and elevated in mouse and human kidney disease. *PLoS One*. 11(5):e0155368.
- Sharkovska Y, Kalk P, Lawrenz B, Godes M, Hoffmann LS, Wellkisch K, Geschka S, Relle K, Hoher B, Stasch JP. 2010. Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase reduces organ damage in experimental low-renin and high-renin models. *J Hypertens*. 28(8):1666-1675.
- Sheng S, Zou M, Yang Y, Guan M, Ren S, Wang X, Wang L, Xue Y. 2021. Mir-23a-3p regulates the inflammatory response and fibrosis in diabetic kidney disease by targeting early growth response 1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 57(8):763-774.
- Shetty A, Hsu JW, Manka PP, Syn W-K. 2018. Role of the circadian clock in the metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 63(12):3187-3206.
- Shi D, Chen J, Wang J, Yao J, Huang Y, Zhang G, Bao Z. 2019. Circadian clock genes in the metabolism of non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Physiology*. 10.
- Shi XJ, Jin Y, Xu WM, Shen Q, Li J, Chen K. 2021. Microrna-23a reduces lipopolysaccharide-induced cellular apoptosis and inflammatory cytokine production

- through rho-associated kinase 1/sirtuin-1/nuclear factor-kappa b crosstalk. *Chin Med J (Engl)*. 134(7):829-839.
- Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. 1996. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated srebp-1a. *J Clin Invest*. 98(7):1575-1584.
- Shu S, Yang Y, Allen CL, Hurley E, Tung KH, Minderman H, Wu Y, Ernstoff MS. 2020. Purity and yield of melanoma exosomes are dependent on isolation method. *J Extracell Vesicles*. 9(1):1692401.
- Sil P, Misono K, Sen S. 1993. Myotrophin in human cardiomyopathic heart. *Circulation Research*. 73(1):98-108.
- Simkin A, Geissler R, McIntyre ABR, Grimson A. 2020. Evolutionary dynamics of microRNA target sites across vertebrate evolution. *PLoS Genet*. 16(2):e1008285.
- Slade N, Moll UM, Brdar B, Zorić A, Jelaković B. 2009. P53 mutations as fingerprints for aristolochic acid: An environmental carcinogen in endemic (balkan) nephropathy. *Mutat Res*. 663(1-2):1-6.
- Smith A, Calley J, Mathur S, Qian H-R, Wu H, Farmen M, Caiment F, Bushel PR, Li J, Fisher C et al. 2016. The rat microRNA body atlas; evaluation of the microRNA content of rat organs through deep sequencing and characterization of pancreas enriched mirnas as biomarkers of pancreatic toxicity in the rat and dog. *BMC Genomics*. 17(1):694.
- Soderland P, Lovekar S, Weiner DE, Brooks DR, Kaufman JS. 2010. Chronic kidney disease associated with environmental toxins and exposures. *Adv Chronic Kidney Dis*. 17(3):254-264.
- Srinivasan S, Yeri A, Cheah PS, Chung A, Danielson K, De Hoff P, Filant J, Laurent CD, Laurent LD, Magee R et al. 2019. Small rna sequencing across diverse biofluids identifies optimal methods for exrna isolation. *Cell*. 177(2):446-462.e416.
- Stolina M, Luo X, Dwyer D, Han C-Y, Chen R, Zhang Y, Xiong Y, Chen Y, Yin J, Ason B et al. 2020. The evolving systemic biomarker milieu in obese zsf1 rat model of human cardiometabolic syndrome: Characterization of the model and cardioprotective effect of gdf15. *bioRxiv*. 2020.2003.2020.000307.
- Strimbu K, Tavel JA. 2010. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 5(6):463-466.
- Strycharz J, Drzewoski J, Szemraj J, Sliwinska A. 2017. Is p53 involved in tissue-specific insulin resistance formation? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017:9270549.
- Su Z, Li Z, Chen T, Li QZ, Fang H, Ding D, Ge W, Ning B, Hong H, Perkins RG et al. 2011. Comparing next-generation sequencing and microarray technologies in a toxicological study of the effects of aristolochic acid on rat kidneys. *Chem Res Toxicol*. 24(9):1486-1493.
- Su Z, Widomski D, Ma J, Namovic M, Nikkel A, Leys L, Olson L, Salte K, Donnelly-Roberts D, Esbenshade T et al. 2016. Longitudinal changes in measured glomerular filtration rate, renal fibrosis and biomarkers in a rat model of type 2 diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 44(5):339-353.
- Su Z, Widomski D, Nikkel A, Leys L, Namovic M, Donnelly-Roberts D, Gopalakrishnan M, McGaraughty S. 2018. Losartan improves renal function and pathology in obese zsf-1 rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 29(3):281-290.
- Summer G, Kuhn AR, Munts C, Miranda-Silva D, Leite-Moreira AF, Lourenço AP, Heymans S, Falcão-Pires I, van Bilsen M. 2020. A directed network analysis of the cardiome identifies molecular pathways contributing to the development of hfpef. *J Mol Cell Cardiol*. 144:66-75.
- Sutherland JJ, Jolly RA, Goldstein KM, Stevens JL. 2016. Assessing concordance of drug-induced transcriptional response in rodent liver and cultured hepatocytes. *PLoS Comput Biol*. 12(3):e1004847.
- Sutherland JJ, Webster YW, Willy JA, Searfoss GH, Goldstein KM, Irizarry AR, Hall DG, Stevens JL. 2018. Toxicogenomic module associations with pathogenesis: A network-based approach to understanding drug toxicity. *Pharmacogenomics J*. 18(3):377-390.

- Svegliati-Baroni G, Pierantonelli I, Torquato P, Marinelli R, Ferreri C, Chatgililoglu C, Bartolini D, Galli F. 2019. Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 144:293-309.
- Takaori K, Nakamura J, Yamamoto S, Nakata H, Sato Y, Takase M, Nameta M, Yamamoto T, Economides AN, Kohno K et al. 2016. Severity and frequency of proximal tubule injury determines renal prognosis. *J Am Soc Nephrol.* 27(8):2393-2406.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. 2004. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research.* 62(1):9-33.
- Tang KW, Toh QC, Teo BW. 2015. Normalisation of urinary biomarkers to creatinine for clinical practice and research--when and why. *Singapore Med J.* 56(1):7-10.
- Tarrant J. 2017. 4.15 - emerging translatable safety biomarkers. In: Chackalamannil S, Rotella D, Ward SE, editors. *Comprehensive medicinal chemistry iii.* Oxford: Elsevier. p. 255-284.
- Tham YK, Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, McMullen JR. 2015. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: Signaling pathways and novel therapeutic targets. *Archives of Toxicology.* 89(9):1401-1438.
- The ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 489(7414):57-74.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK et al. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (misev2018): A position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the misev2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles.* 7(1):1535750.
- Thielemans N, Lauwerys R, Bernard A. 1994. Competition between albumin and low-molecular-weight proteins for renal tubular uptake in experimental nephropathies. *Nephron.* 66(4):453-458.
- The loop of henle. 2019. *News Medical Life Sciences*; [accessed 2022 13.01.].
- Thompson KL, Boitier E, Chen T, Couttet P, Ellinger-Ziegelbauer H, Goetschy M, Guillemain G, Kanki M, Kelsall J, Mariet C et al. 2016. Absolute measurement of cardiac injury-induced micrnas in biofluids across multiple test sites. *Toxicol Sci.* 154(1):115-125.
- Tofovic SP, Kost CK, Jr., Jackson EK, Bastacky SI. 2002. Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, zsf1 (fa-fa(cp)) rats. *Kidney Int.* 61(4):1433-1444.
- Tofovic SP, Kusaka H, Kost CK, Jr., Bastacky S. 2000. Renal function and structure in diabetic, hypertensive, obese zdfxshhf-hybrid rats. *Ren Fail.* 22(4):387-406.
- Togashi Y, Imura N, Miyamoto Y. 2013. Urinary cystatin c as a renal biomarker and its immunohistochemical localization in anti-gbm glomerulonephritis rats. *Exp Toxicol Pathol.* 65(7-8):1137-1143.
- Tonneijck L, Muskiet MH, Smits MM, van Bommel EJ, Heerspink HJ, van Raalte DH, Joles JA. 2017. Glomerular hyperfiltration in diabetes: Mechanisms, clinical significance, and treatment. *J Am Soc Nephrol.* 28(4):1023-1039.
- Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. 2017. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases.* 8(4):220-232.
- Triplitt CL. 2012. Understanding the kidneys' role in blood glucose regulation. *Am J Manag Care.* 18(1 Suppl):S11-16.
- Ueda S, Ozawa S, Mori K, Asanuma K, Yanagita M, Uchida S, Nakagawa T. 2015. Enos deficiency causes podocyte injury with mitochondrial abnormality. *Free Radical Biology and Medicine.* 87:181-192.
- Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. 2008. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 48:463-493.
- van Dijk CG, Oosterhuis NR, Xu YJ, Brandt M, Paulus WJ, van Heerebeek L, Duncker DJ, Verhaar MC, Fontoura D, Lourenço AP et al. 2016. Distinct endothelial cell responses in the heart and kidney microvasculature characterize the progression of heart failure with preserved ejection fraction in the obese zsf1 rat with cardiorenal metabolic syndrome. *Circ Heart Fail.* 9(4):e002760.

- Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'Agostino RB, Levy D. 2002. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The framingham heart study. *Jama*. 287(8):1003-1010.
- Vignon-Zellweger N, Heiden S, Miyauchi T, Emoto N. 2012. Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life Sciences*. 91(13):490-500.
- Vlasakova K, Erdos Z, Troth SP, McNulty K, Chapeau-Campredon V, Mokrzycki N, Muniappa N, Gu YZ, Holder D, Bailey WJ et al. 2014. Evaluation of the relative performance of 12 urinary biomarkers for renal safety across 22 rat sensitivity and specificity studies. *Toxicol Sci*. 138(1):3-20.
- Wadey RM, Pinches MG, Jones HB, Riccardi D, Price SA. 2014. Tissue expression and correlation of a panel of urinary biomarkers following cisplatin-induced kidney injury. *Toxicol Pathol*. 42(3):591-602.
- Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre JV. 2010. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int*. 78(5):486-494.
- Walker Amy K, Jacobs René L, Watts Jennifer L, Rottiers V, Jiang K, Finnegan Deirdre M, Shioda T, Hansen M, Yang F, Niebergall Lorissa J et al. 2011. A conserved srebp-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans. *Cell*. 147(4):840-852.
- Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. 2010. Export of micrnas and micrna-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 38(20):7248-7259.
- Wang N, Zhou Y, Jiang L, Li D, Yang J, Zhang CY, Zen K. 2012. Urinary micrna-10a and micrna-30d serve as novel, sensitive and specific biomarkers for kidney injury. *PLoS One*. 7(12):e51140.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. 2010. The micrna spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 56(11):1733-1741.
- Wei B, Liu YS, Guan HX. 2020. Micrna-145-5p attenuates high glucose-induced apoptosis by targeting the notch signaling pathway in podocytes. *Exp Ther Med*. 19(3):1915-1924.
- Whaley-Connell AT, Chowdhury NA, Hayden MR, Stump CS, Habibi J, Wiedmeyer CE, Gallagher PE, Tallant EA, Cooper SA, Link CD et al. 2006. Oxidative stress and glomerular filtration barrier injury: Role of the renin-angiotensin system in the ren2 transgenic rat. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 291(6):F1308-F1314.
- Diabetes. 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>; [accessed 2021 18. Oktober].
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in c. *Elegans*. *Cell*. 75(5):855-862.
- Williams ME. 2005. Diabetic nephropathy: The proteinuria hypothesis. *American Journal of Nephrology*. 25(2):77-94.
- Wolenski FS, Shah P, Sano T, Shinozawa T, Bernard H, Gallacher MJ, Wyllie SD, Varrone G, Cicia LA, Carsillo ME et al. 2017. Identification of micrna biomarker candidates in urine and plasma from rats with kidney or liver damage. *Journal of Applied Toxicology*. 37(3):278-286.
- Woroniecka KI, Park AS, Mohtat D, Thomas DB, Pullman JM, Susztak K. 2011. Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease. *Diabetes*. 60(9):2354-2369.
- Wu C, Wang Q. 2016. P53/micrnas signaling in the pathological mechanism of diabetic kidney disease. *Inflammation and Cell Signaling*. 3.
- Wu HJ, Yiu WH, Li RX, Wong DW, Leung JC, Chan LY, Zhang Y, Lian Q, Lin M, Tse HF et al. 2014. Mesenchymal stem cells modulate albumin-induced renal tubular inflammation and fibrosis. *PLoS One*. 9(3):e90883.
- Wu J, He Y, Luo Y, Zhang L, Lin H, Liu X, Liu B, Liang C, Zhou Y, Zhou J. 2018. Mir-145-5p inhibits proliferation and inflammatory responses of rmc through regulating akt/gsk pathway by targeting cxcl16. *J Cell Physiol*. 233(4):3648-3659.
- Wu Q, Poulsen SB, Murali SK, Grimm PR, Su XT, Delpire E, Welling PA, Ellison DH, Fenton RA. 2021. Large-scale proteomic assessment of urinary extracellular vesicles

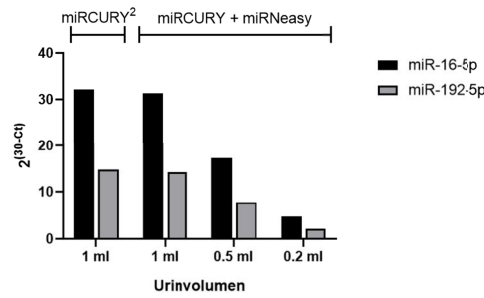
- highlights their reliability in reflecting protein changes in the kidney. *J Am Soc Nephrol*.
- Xie X, Atkins E, Lv J, Bennett A, Neal B, Ninomiya T, Woodward M, MacMahon S, Turnbull F, Hillis GS et al. 2016. Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: Updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 387(10017):435-443.
- Xu K, Lin J, Zandi R, Roth JA, Ji L. 2016. MicroRNA-mediated target mRNA cleavage and 3'-uridylation in human cells. *Scientific Reports*. 6(1):30242.
- Xu K, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang Z, Qian S, Zou X, Chen S, Zuo L, Chen M et al. 2021. Mir-125b-5p enclosed in hypoxic HK2 cell-derived extracellular vesicles alleviates renal ischemia-reperfusion injury by regulating NLR5. *Archives of Medical Science*.
- Yamaguchi H, Igarashi M, Hirata A, Tsuchiya H, Sugiyama K, Morita Y, Jimbu Y, Ohnuma H, Daimon M, Tominaga M et al. 2004. Progression of diabetic nephropathy enhances the plasma osteopontin level in type 2 diabetic patients. *Endocr J*. 51(5):499-504.
- Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, Lawhorne L, Treiber G. 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*. 40(3):734-744.
- Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. 1993. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(5):1814-1818.
- Yu Y, Bai F, Qin N, Liu W, Sun Q, Zhou Y, Yang J. 2018. Non-proximal renal tubule-derived urinary exosomal mir-200b as a biomarker of renal fibrosis. *Nephron*. 139(3):269-282.
- Yuan W, Liu L, Liang L, Huang K, Deng Y, Dong M, Chen J, Wang G, Zou F. 2020. Mir-122-5p and mir-326-3p: Potential novel biomarkers for early detection of cadmium exposure. *Gene*. 724:144156.
- Zambad SP, Munshi S, Dubey A, Gupta R, Busiello RA, Lanni A, Goglia F, Gupta RC, Chauthaiwale V, Dutt C. 2011. Trc150094 attenuates progression of nontraditional cardiovascular risk factors associated with obesity and type 2 diabetes in obese zsf1 rats. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 4:5-16.
- Zanchi C, Macconi D, Trionfini P, Tomasoni S, Rottoli D, Locatelli M, Rudnicki M, Vandesompele J, Mestdagh P, Remuzzi G et al. 2017. MicroRNA-184 is a downstream effector of albuminuria driving renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 60(6):1114-1125.
- Zang J, Maxwell AP, Simpson DA, McKay GJ. 2019. Differential expression of urinary exosomal microRNAs mir-21-5p and mir-30b-5p in individuals with diabetic kidney disease. *Sci Rep*. 9(1):10900.
- Zhang S, Wu J, Zhu X, Song H, Ren L, Tang Q, Xu X, Liu C, Zhang J, Hu W et al. 2021. A novel approach to identify the mechanism of mir-145-5p toxicity to podocytes based on the essential genes targeting analysis. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 26:749-759.
- Zhao Y-C, Zhao G-J, Chen Z, She Z-G, Cai J, Li H. 2020a. Nonalcoholic fatty liver disease. *Hypertension*. 75(2):275-284.
- Zhao Y-Y, Wang H-L, Cheng X-L, Wei F, Bai X, Lin R-C, Vaziri ND. 2015. Metabolomics analysis reveals the association between lipid abnormalities and oxidative stress, inflammation, fibrosis and Nrf2 dysfunction in aristolochic acid-induced nephropathy. *Scientific Reports*. 5(1):12936.
- Zhao Y, Shen A, Guo F, Song Y, Jing N, Ding X, Pan M, Zhang H, Wang J, Wu L et al. 2020b. Urinary exosomal miRNA-4534 as a novel diagnostic biomarker for diabetic kidney disease. *Frontiers in Endocrinology*. 11(590).
- Zhao Y, Wong L, Goh WWB. 2020c. How to do quantile normalization correctly for gene expression data analyses. *Scientific Reports*. 10(1):15534.
- Zheng Y, Ley SH, Hu FB. 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 14(2):88-98.
- Zhong J, Yang HC, Fogo AB. 2017. A perspective on chronic kidney disease progression. *Am J Physiol Renal Physiol*. 312(3):F375-f384.



- Zhou B, Perel P, Mensah GA, Ezzati M. 2021. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. *Nature Reviews Cardiology*. 18(11):785-802.
- Zhou X, Mao A, Wang X, Duan X, Yao Y, Zhang C. 2013. Urine and serum microrna-1 as novel biomarkers for myocardial injury in open-heart surgeries with cardiopulmonary bypass. *PLoS One*. 8(4):e62245.
- Zhou X, Qu Z, Zhu C, Lin Z, Huo Y, Wang X, Wang J, Li B. 2016. Identification of urinary microrna biomarkers for detection of gentamicin-induced acute kidney injury in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 78:78-84.
- Zhou X, Zhang J, Haimbach R, Zhu W, Mayer-Ezell R, Garcia-Calvo M, Smith E, Price O, Kan Y, Zycband E et al. 2017. An integrin antagonist (mk-0429) decreases proteinuria and renal fibrosis in the zsf1 rat diabetic nephropathy model. *Pharmacol Res Perspect*. 5(5).
- Zielińska KA, Katanaev VL. 2020. The signaling duo cxcl12 and cxcr4: Chemokine fuel for breast cancer tumorigenesis. *Cancers*. 12(10):3071.
- Zobel C, Zavidou-Saroti P, Bölck B, Brixius K, Reuter H, Frank K, Diedrichs H, Müller-Ehmsen J, Bloch W, Schwinger RH. 2007. Altered tension cost in (tg(mren-2)27) rats overexpressing the mouse renin gene. *Eur J Appl Physiol*. 99(2):121-132.
- Zolk O, Quatteck J, Seeland U, El-Armouche A, Eschenhagen T, Böhm M. 2002. Activation of the cardiac endothelin system in left ventricular hypertrophy before onset of heart failure in tg(mren2)27 rats. *Cardiovasc Res*. 53(2):363-371.
- Zuber AM, Centeno G, Pradervand S, Nikolaeva S, Maquelin L, Cardinaux L, Bonny O, Firsov D. 2009. Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(38):16523-16528.

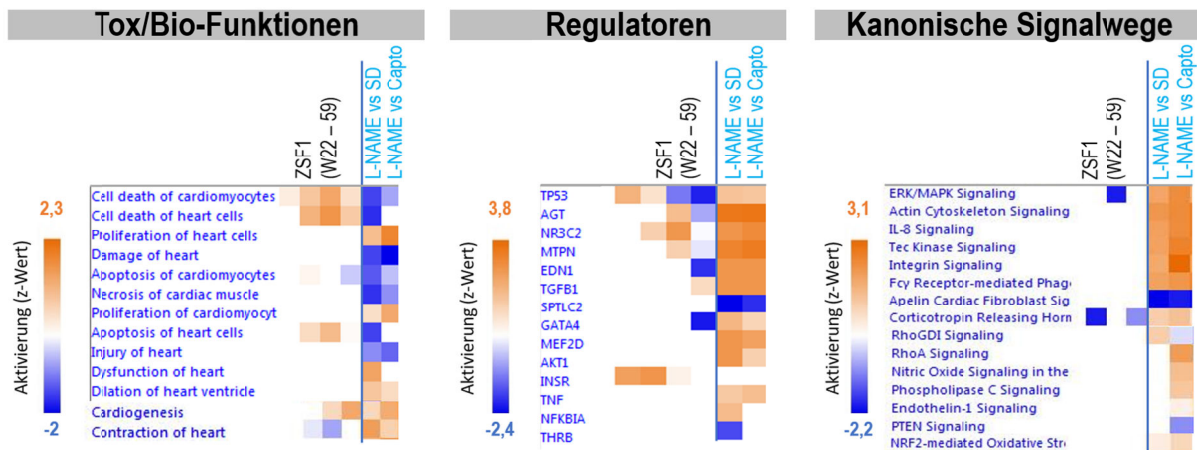
# Anhang

## Abbildungen



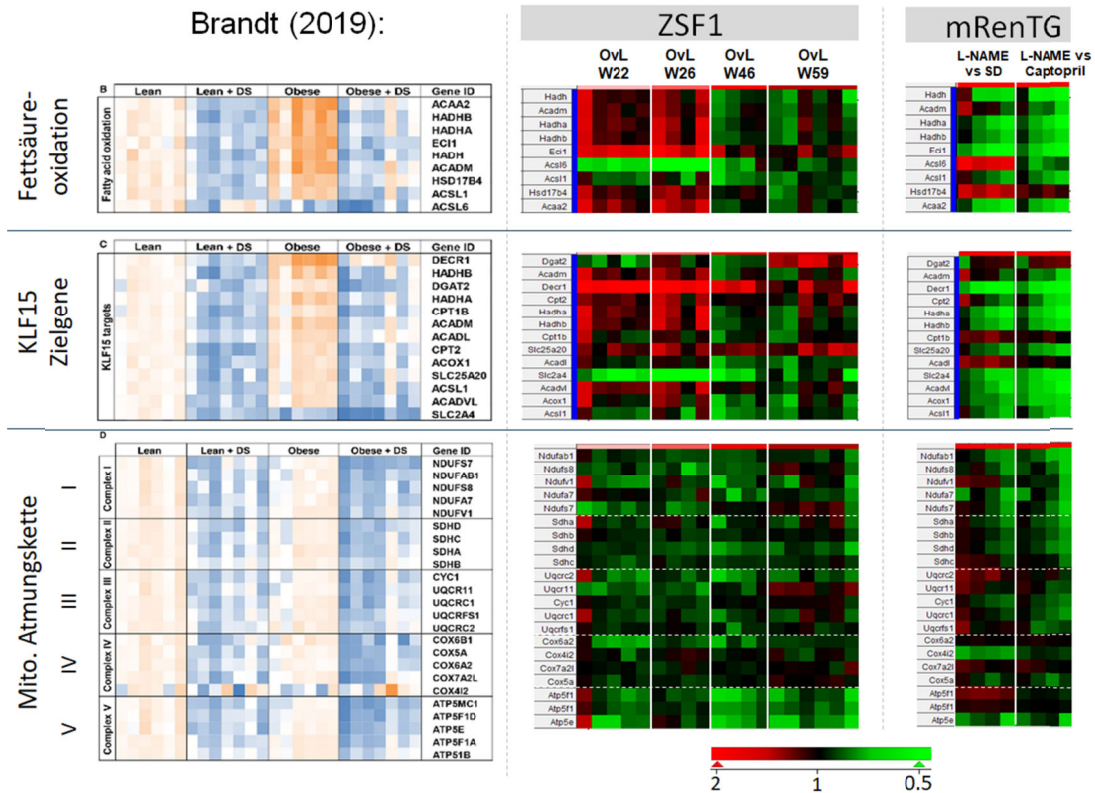
### ANHANG-ABBILDUNG 27: METHODENVERGLEICH EV-MIRNA ISOLATION

Absolute Mengen von miR-16-5p und miR-192-5p nach EV-Isolation aus 0,2, 0,5 und 1 ml ZSF1 Urin mittels des miRCURY Exosome Isolation Kits von Qiagen/Norgen kombiniert mit dem miRNeasy Mini Kit von Qiagen (miRCURY + miRNeasy) oder dem miRCURY RNA Isolation Kits – Cells and Plants von Norgen (miRCURY<sup>2</sup>). Die Detektion erfolgte mittels miRCURY qRT-PCR. Dargestellt sind absolute Werte nach Auswertung nach der modifizierten  $\Delta C_t$ -Methode ohne Normalisierung auf Urin-Kreatinin (n=1). Ct: engl. Cycle threshold. miR: microRNA.



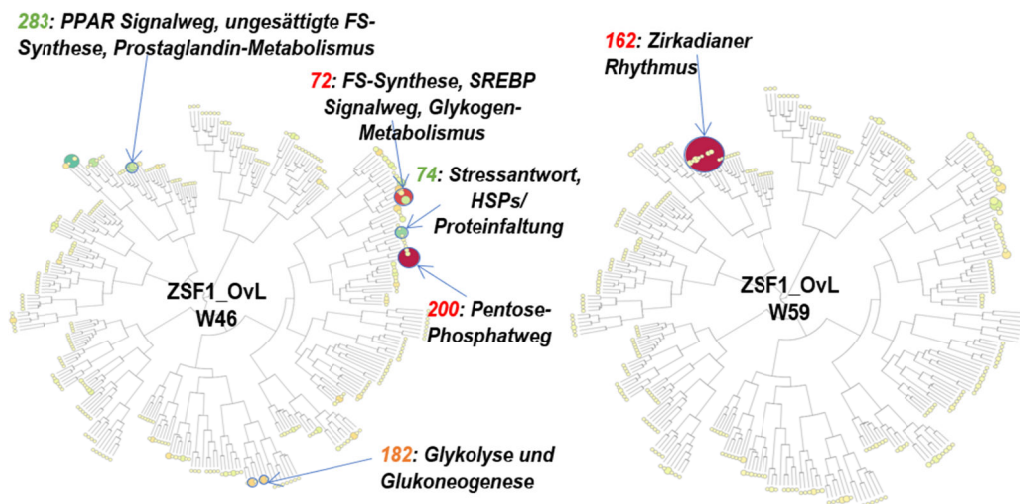
### ANHANG-ABBILDUNG 28: IPA-ANALYSE DES HERZENS IN ZSF1- UND mRENTG-RATTEN

IPA-basierte Analyse in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME relativ zu SD-Ratten oder relativ zu mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Captopril-Behandlung (n=5), sowie in fettleibigen und schlanken 22, 26, 46 und 59 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Tieren relativ zu schlanken ZSF1-Ratten (W22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). a) Tox und Bio-Funktionen. b) Übergeordnete Regulatoren. c) Kanonische Signalwege. Für die Analyse wurden nur im jeweiligen Tiermodell signifikant deregulierte Gene verwendet (Welch-Test für mRenTG-Ratten und nAnova für ZSF1-Ratten mit  $p \leq 0,05$ ; Effektgröße  $> 1,7$ ; minimale Signalstärke 20). IPA-Ergebnisse mit einem Aktivierungsgrad (z-Wert) von  $z \leq -2/ \geq 2$  mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,005$  wurden als signifikant bewertet. W: Woche. mRenTG: Renin2-transgene Ratten. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester. Capto: Captopril.



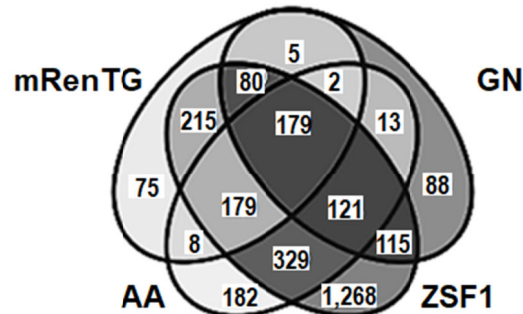
**ANHANG-ABBILDUNG 29: EXPRESSION KARDIALER GENEN MIT BEDEUTUNG IN DER FETTSÄUREOXIDATION, DEM KLF15 SIGNALWEG UND DER MITOCHONDRIALEN ATMUNGSKETTE IN ZSF1- UND MRENTG-RATTEN.**

Genexpressionsanalyse in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME relativ zu mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit Captopril oder relativ zu SD-Ratten (n=5), sowie in fettleibigen und schlanken 22, 26, 46 und 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (W22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die Ergebnisse wurden mit publizierten Datensätzen von Brandt et al (2019) aus ZSF1-Ratten verglichen. Alle Profile wurden mit Affymetrix Mikroarrays gemessen. Es ist die relative Genexpression in den L-NAME-Ratten oder fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen mit dem arithmetischen Mittelwerte der entsprechenden Kontrollen gezeigt. Die Genexpressionsprofile dieser Gengruppen sind als Heatmap dargestellt. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester. Capto: Captopril. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. SD: Sprague-Dawley-Ratten. W: Woche. OvL: Fettleibig relativ zu schlank. Mito: Mitochondriale. Lean: Schlank. Obese: Fettleibig.



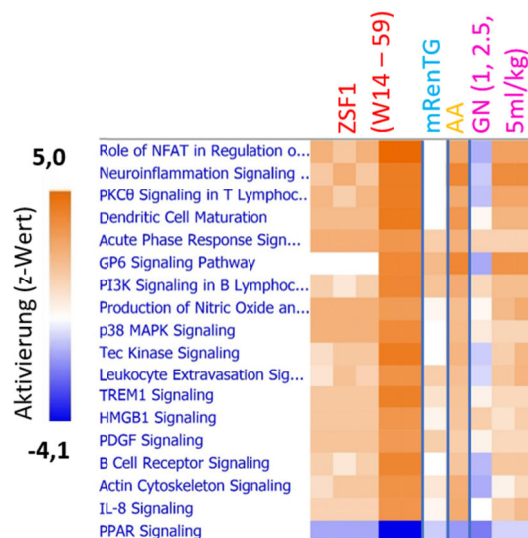
**Anhang-Abbildung 30: ERGEBNISSE DER WGCNA-ANALYSE IN DER LEBER VON ZSF1-RATTEN** Relevante Module, welche in der WGCNA für 46 und 59 Wochen alte ZSF1-Ratten (W46: n=4; W59: n=6) identifiziert wurden. Für die Analyse wurden Mittelwerte signifikant deregulierte Gene in den

angegebenen Gruppen verglichen zu den entsprechenden Kontrollen verwendet (nAnova  $p \leq 0,05$ ; Effektgröße  $> 1,7$ ; minimale Signalstärke 20). Module mit einem positiven EGS sind in orange und rot dargestellt, Module mit einem negativen EGS in grün und blau. Die funktionelle Annotation erfolgte durch Gene Ontology-Überrepräsentationsanalyse. Die WGCNA wurde in der TXG-MAPr Webapplikation durchgeführt. W: Woche. OvL: Fettleibig relativ zu schlank. HSP: Hitzeschock-Proteine. FS: Fettsäure. PPAR: Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor.



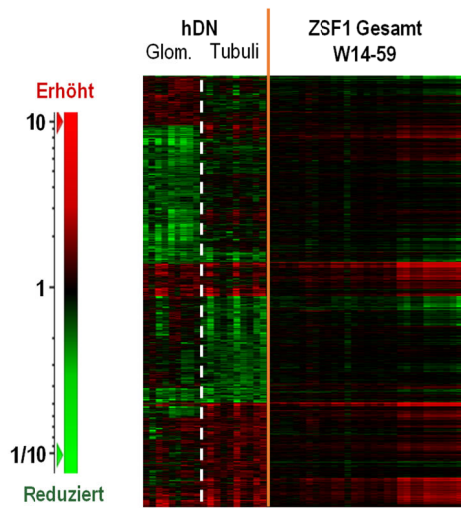
### ANHANG-ABBILDUNG 31: ANZAHL DEREGULIERTER GENE IN DER NIERE VERSCHIEDENER TIERMODELLE FÜR NIERENSCHÄDEN

Venn-Diagramm signifikant deregulierter Gene in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME relativ zu Captopril-behandelten mRenTG-Ratten (n=5) sowie in fettleibigen relativ zu schlanken 14, 22, 26, 46 und 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (W14/22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die Ergebnisse wurden mit publizierten Datensätzen von AA-behandelten Ratten (n=6) und NTS-induzierter GN (NTS: n=5; Kontrollen n=3) relativ zu unbehandelten Kontrollen verglichen. Für das GN-Rattenmodell wurden alle Gene mit signifikanten Veränderungen in der niedrigen, mittleren und hohen Dosisgruppe für diese Darstellung vereinigt. Alle Genexpressionen wurden mit Mikroarrays gemessen. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. SD: Sprague-Dawley-Ratten. NTS: Nephrotoxisches Serum. AA: Aristolochiasäure. GN: Glomerulonephritis.



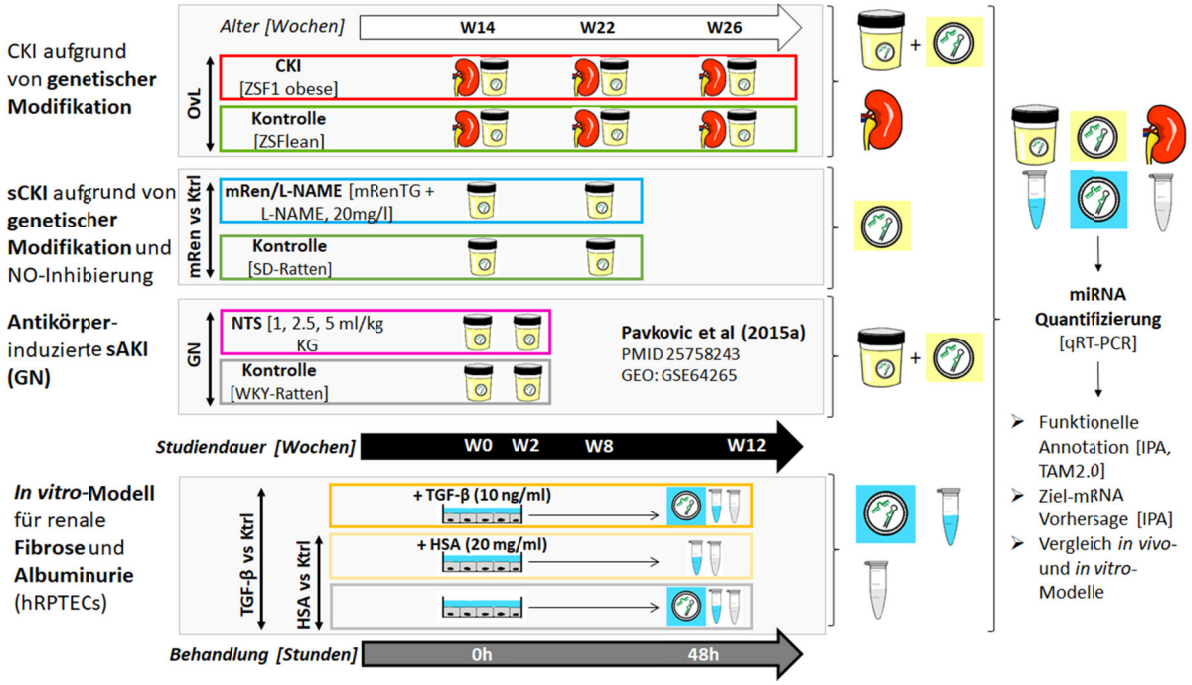
### ANHANG-ABBILDUNG 32: IPA-ANALYSE DER NIERE IN ZSF1- UND mREN2TG-RATTEN, UND RATTENMODELLEN AA-INDUZIERTER NEPHROPATHIE UND GLOMERULONEPHRITIS

IPA-basierte Analyse in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME (n=5) sowie in fettleibigen und schlanken 14, 22, 26, 46 und 59 Wochen alten ZSF1-Ratten (W14/22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die Ergebnisse wurden mit publizierten Datensätzen von AA-behandelten Ratten (n=6) und durch drei verschiedene Konzentrationen NTS-induzierter GN (NTS: n=5; Kontrollen n=3) verglichen. Gezeigt sind kanonische Signalwege. Für die Analyse wurden nur im jeweiligen Tiermodell signifikant deregulierte Gene verwendet (Welch/nAnova  $p \leq 0,05$ ; Effektgröße  $> 1,7$ ; minimale Signalstärke 20). IPA-Ergebnisse mit einem Aktivierungsgrad (z-Wert) von  $z \leq -2$  /  $\geq 2$  mit einer Wahrscheinlich von  $p \leq 0,005$  wurden als signifikant bewertet. W: Woche. mRenTG: Renin2-transgene Ratten. AA: Aristolochiasäure. GN: Glomerulonephritis.



**ANHANG-ABBILDUNG 33: RENALE GENEXPRESSION IN ZSF1-RATTEN, UND IN GLOMERULI UND TUBULI VON PATIENTEN MIT DIABETISCHER NEPHROPATHIE**

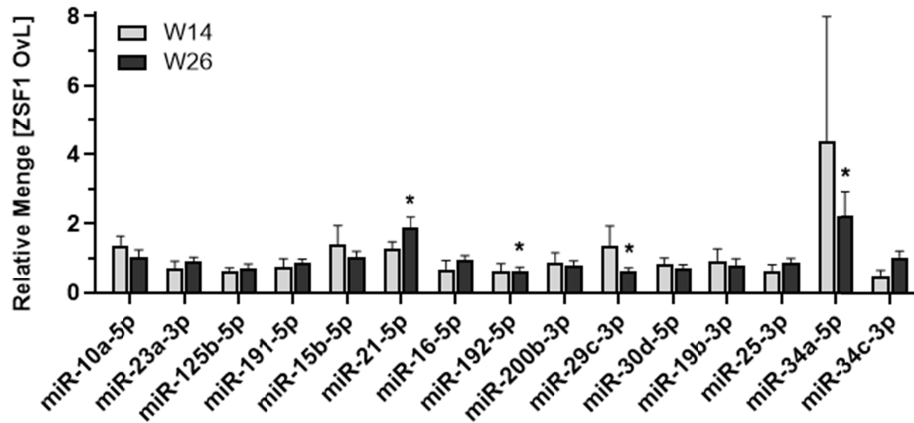
a) Genexpressionsprofile im Gesamthomogenat der Niere von 14 bis 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (Gesamt: W14/22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die Ergebnisse wurden mit einem publizierten Datensatz mit Genexpressionsdaten in Glomeruli und Tubuli von Patienten mit DN (Woroniecka et al, 2011; n=5 (Glomeruli), n=8 (Tubuli)) verglichen. Die Genexpression wurde mit Hilfe von Affymetrix Mikroarrays bestimmt. Es ist die relative Genexpression in fettleibigen ZSF1-Ratten relativ zum arithmetischen Mittelwerte der entsprechenden Kontrollen und in DN-Patienten relativ zum arithmetischen Mittelwert von Menschen ohne hDN gezeigt. Genexpressionsprofile sind dargestellt als Heatmap einschließlich hierarchischem Clustering. hDN: humane diabetische Nephropathie. W: Woche. Glom.: Glomeruli-angereichert. Gesamt: Gewebehomogenat der gesamten Niere.



**ANHANG-ABBILDUNG 34: ÜBERSICHT STUDIEN URIN-MIRNAS**

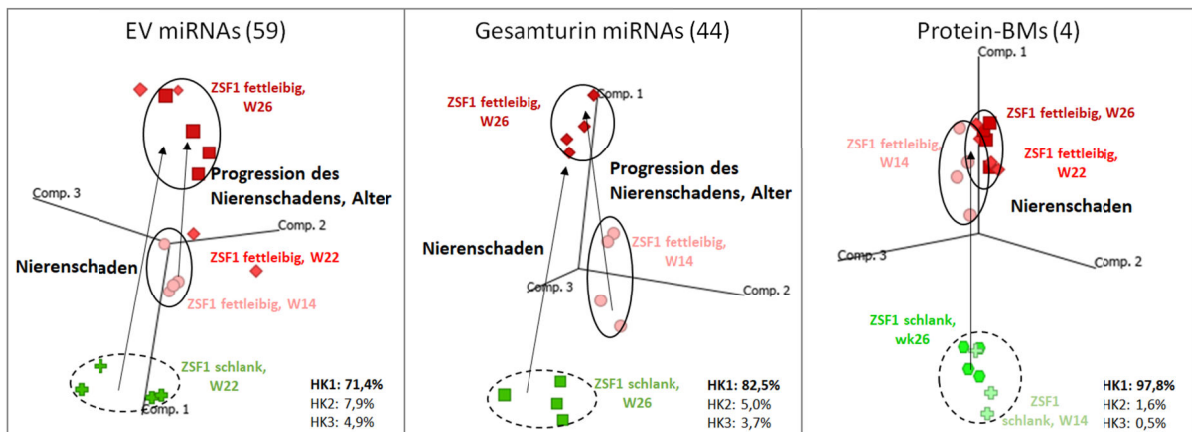
GN: Glomerulonephritis. sAKI: engl. *Sub-acute kidney injury*. (s)CKI: engl. *(Sub-)Chronic kidney injury*. NTS: Nephrotoxisches Serum. WKY: Wistar-Kyoto. KG: Körpergewicht. Ktrl: Kontrolle. IPA: engl. *Ingenuity-pathway analysis*. NO: Stickstoffmonoxid. L-NAME: N(ω)-nitro-L-Argininmethylester. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. W: Wochen. OvL: Fettleibig relativ zu schlank. hRPTECs: Humane renale proximale Tubulusepithelzellen. HSA: Humanes Serumalbumin. TGF-β: engl. *Tumor growth factor beta*.





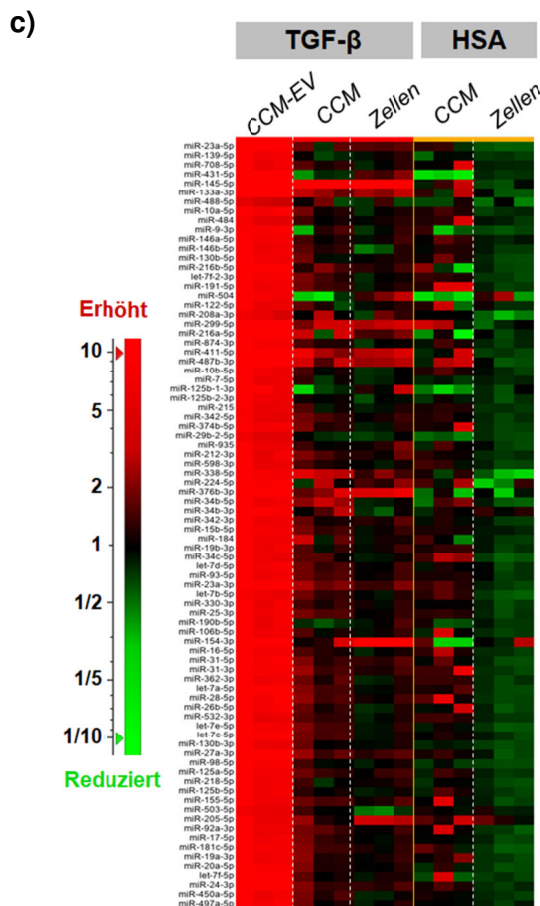
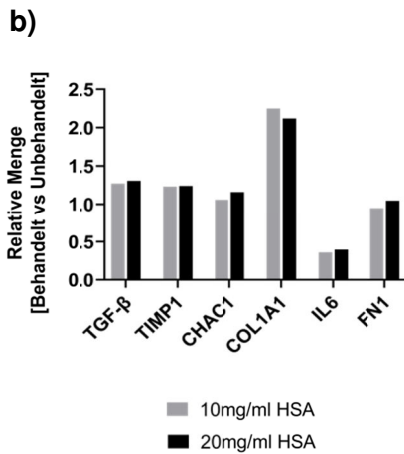
### ANHANG-ABBILDUNG 35: MIRNAS IM NIERENGEWEBE VON ZSF1-RATTEN

Quantifizierung von 15 ausgewählten miRNAs im Nierengewebe von 14 und 26 Wochen alten, fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten mittels individueller qRT-PCR Assays (Woche 14: n= 4; Woche 26: n=8). Ergebnisse wurden nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode auf U6 normalisiert. Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur schlanken Kontrolle. Es sind relative Mengen einschließlich Standardabweichung fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur gleichaltrigen Kontrolle gezeigt. Statistische Signifikanz ist als \*  $p \leq 0,05$  dargestellt. miR: microRNA. W: Woche. OvL: Fettleibig relativ zu schlank.



### ANHANG-ABBILDUNG 36: HAUPTKOMPONENTEN-ANALYSE BASIEREND AUF DEREGULIERTEN MIRNAS IN ZSF1 URIN-EVs UND GESAMTURIN.

Hauptkomponenten-Analyse von 111 ausgewählten miRNAs im Gesamturin (44) oder Urin-EVs (59) und vier Protein-Biomarker im Gesamturin fettleibiger, 14, 22 und 26 Wochen alter ZSF1-Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle (n=4). Ausgewählt wurden miRNAs mit statistisch signifikant veränderten Konzentrationen in 26 Wochen alten, fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zu 14 Wochen alten fettleibigen Ratten. Statistische Analyse erfolgte mittels eines zweifachen ANOVA einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zu Woche 14. Zusätzlich wurden miRNAs für die HKA gewählt, welche eine nicht-statistisch signifikante Tendenz zu veränderten Konzentrationen zeigten. Eine Kovarianzmatrix-basierte HKA wurde basierend auf den genannten miRNAs durchgeführt. Farben und Formen zeigen die verschiedenen Versuchsgruppen (fettleibig oder schlank, Alter) an. Die Pfeile bilden CKD- oder altersabhängige Veränderungen von miRNA- oder Proteinkonzentrationen im Urin ab. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta Ct$ -Methode einschließlich Kreatinin-Normalisierung ausgewertet. EV: Extrazelluläre Vesikel. W: Woche. Comp: Komponente. HKA: Hauptkomponentenanalyse. HK: Hauptkomponente. FDR: engl. *False discovery rate*. miRNA: microRNA. BM: Biomarker.



**ANHANG-ABBILDUNG 37: STUDIENDESIGN, GENEXPRESSION NACH HSA-BEHANDLUNG UND MIRNA-PROFILE IN hRPTECS UND ZELLKULTURMEDIUM NACH BEHANDLUNG MIT TGF-B UND HSA.**

a) Überblick über das *in vitro* Studiendesign zur Quantifizierung von mRNA und miRNAs und Zellmorphologie in hRPTECs nach Behandlung mit TGF- $\beta$  (10 ng/ml) oder HSA (20 mg/ml) für 48 Stunden. Maßstab: 100  $\mu$ m. b) Genexpression von bekannten HSA-Zielgenen in hRPTECs nach Behandlung mit HSA (10 und 20 mg/ml) für 48 Stunden (n=1). mRNA wurde mittels TaqMan-basierter qRT-PCR quantifiziert und nach der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode einschließlich Normalisierung auf GAPDH ausgewertet. Dargestellt sind mRNA-Mengen in behandelten Zellen relativ zur unbehandelten Kontrolle. c) Hierarchisches Clustering von 93 miRNAs in Zellen (n=3) und Zellkulturmedium (Gesamt und EVs, je n=3) nach Behandlung von hRPTECs mit TGF- $\beta$  (10 ng/ml) und HSA (20 mg/ml) für 48 Stunden. Es sind relative Mengen in behandelten hRPTECs relative zum Mittelwert der Kontrolle in Form einer Heatmap gezeigt. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR-Platten (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta$ Ct-Methode ohne Kreatinin-Normalisierung (Zellkulturmedium) oder der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode einschließlich Normalisierung auf U6 (hRPTECs) ausgewertet. hRPTEC: humane renale proximale Tubulusepithelzellen. TGF- $\beta$ : engl. *Tumor growth factor beta*. HSA: Humanes Serum-albumin. EV: Extrazelluläre Vesikel. CCM: engl. *Cell-conditioned medium* (zell-konditioniertes Medium). Mio: Million. h: Stunde(n). SV40: Simianes Virus 40. miRNA: microRNA. mRNA: Messenger-RNA.

## Tabellen

### ANHANG-TABELLE 24: KÖRPERGEWICHT, URINAUSSCHIEDUNG UND PROTEINGEHALT UND KREATININ-GEHALT IM URIN DES mRENTG-RATTENMODELLS

Rohdaten von Körpergewicht (n=9-10), Urinausscheidung (n=4-5), Proteingehalt im Urin (n=4-5) und Kreatiningehalt im Urin (n=10) von mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME (30 mg/kg) oder SD-Kontrollen. Urinausscheidung wurde in metabolischen Käfigen bestimmt und ist auf die Dauer der Urinkollektion in Stunden bezogen angegeben. Gesamtprotein wurde mit der Pyrogallol Rot-Methode quantifiziert und auf den Kreatiningehalt im Urin normalisiert. mRenTG: Maus Renin-transgen. SD: Sprague-Dawley-Ratte. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester.

Genotyp	SD						mRenTG								
Behandlung	keine			L-NAME			Captopril			Captopril + L-NAME			L-NAME		
<b>Körpergewicht [g]</b>															
W0	292	319	314	320	317	316	315	310	304	286	304	296	289	294	302
	337	345	350	330	339	337	334	258	294	346	328	299	302	318	343
	338	345	363	349	354	350	285	283	346	291	299	333	279	291	300
W8	450	547	501	540	522	502	491	489	479	459	495	486	459	408	474
	542	564	536	515	540	539	532	448	453	559	546	560	509	462	521
	544	504	575	548	586	559	481	475	543	504	500	548	443	473	434
	574						509			439			463		
<b>Urinausscheidung [ml/h]</b>															
W0	1,40	1,45		1,95	1,70	1,85	3,40	2,50	2,55	2,03	2,45	2,25	2,85	3,18	
	2,15	2,43		1,45	0,60		2,90	2,68		2,35	2,50		2,48	3,3	
W8	2,68	3,05		2,25	2,80	2,58	3,30	3,23	3,05	3,38	3,90	3,98	5,23	6,15	
	2,85	3,05		3,50	2,80		3,50	3,30		2,75	2,50		5,80	6,65	
<b>Proteingehalt [g/l]</b>															
W0	0,18	0,35	0,11	0,14	0,18	0,10	0,16	0,17	0,15	0,20	0,25	0,13	0,07	0,14	0,11
	0,21			0,22	0,55		0,11	0,21		0,12	0,14		0,26		
W8	0,11	0,17	0,16	0,20	0,17	0,12	0,28	0,39	0,26	0,26	0,25	0,20	1,16	1,04	
	0,13			0,13	0,20		0,21	0,37		0,19	0,26		1,39	1,01	
<b>Kreatinin [mmol/l]</b>															
W0	1,92	2,01	3,38	1,76	2,52	2,09	1,36	1,6	1,5	1,46	1,8	1,28	1,38	1,63	1,18
	2,47	2,86	2,25	1,85	2,76	2,74	1,81	1,3	1,13	1,26	1,5	1,02	1,24	1,35	1,01
	2,19	2,46	3,74	2,59	3,55	2,16	1,22	1,55	1,53	2,05	1,71	1,41	1,81	1,34	1,61
	3,54			2,11			1,68			1,86			1,25		
W8	2,02	2,24	3,45	2,99	2,49	2,92	2,52	2,37	2,34	1,89	2,05	2,04	1,4	1,77	1,88
	2,54	2,33	3,28	2,52	3,03	2,26	2,54	2,12	2,75	2,13	2,97	2,34	1,29	1,6	1,49
	2,56	2,99	2,85	2,69	1,95	2,2	2,05	2,48	3,07	2,19	1,34	2,18	1,34	1,76	1,6
	4,28			2,84			2,71			2,11			1,42		
<b>Protein/Kreatinin [mg/mmol]</b>															
W0	78	104	68	80	71	48	118	106	100	137	139	102	208	110	157
	73	122	49	135	72	69	122	69	124	95	93	108	161	184	82
	96	110	102	85	155	116	90	135	98	63	105	113	122	77	478
	147			90			137			97			192		
W8	59	98	90	67	68	41	111	165	111	138	122	98	886	401	617
	43	73	49	111	66	44	102	104	193	89	88	120	806	263	356
	51	47	77	48	103	77	102	149	130	105	82	92	425	347	744
	82			49			125			147			979		

### ANHANG-TABELLE 25: KÖRPERGEWICHT, URINAUSSCHIEDUNG UND PROTEINGEHALT UND KREATININ-GEHALT IM URIN DES ZSF1-RATTENMODELLS

Rohdaten von Körpergewicht, Urinausscheidung, Proteingehalt im Urin und Kreatiningehalt im Urin 14, 22 und 26 Wochen alter, fettleibiger und schlanker ZSF1-Ratten (n=4). Urinausscheidung wurde in metabolischen Käfigen bestimmt und ist auf die Dauer der Urinkollektion in Stunden bezogen angegeben. Gesamtprotein wurde mit der Pyrogallol Rot-Methode quantifiziert und auf den Kreatiningehalt im Urin normalisiert.

Alter	Woche 14				Woche 22				Woche 26			
<b>Körpergewicht [g]</b>												
fettleibig	547	551	512	545	668	604	637	651	693	628	671	675
schlank	393	379	374	390	442	426	443	427	485	472	483	470
<b>Urinvolumen [ml/h]</b>												
fettleibig	1,3	1,4	1,3	1,4	1,1	1,1	0,8	1,0	1,7	2,0	1,4	1,5
schlank	0,3	0,2	0,1	0,6	0,5	0,8	0,4	0,6	0,7	0,5	0,4	0,7
<b>Proteingehalt [g/l]</b>												
fettleibig	2,73	3,97	3,27	2,05	3,78	5,00	4,20	6,94	5,53	8,12	6,69	6,53
schlank	0,99	1,62	1,65	1,27	1,08	0,77	0,43	0,85	1,14	1,09	1,03	1,06



Kreatinin [mmol/l]												
fettleibig	3,84	5,12	3,77	3,08	3,44	3,22	3,12	4,44	3,69	4,50	3,39	3,43
schlank	7,37	15,45	14,65	11,20	10,02	8,64	8,96	8,64	10,66	11,88	9,34	9,99
Protein/Kreatinin [mg/mmol]												
fettleibig	710,90	775,40			1098,8	1552,8			1498,6	1804,4		
	867,40	665,60			1346,2	1563,1			1973,5	1903,8		
schlank	134,30	104,90			107,80	89,10			106,90	91,80		
	112,60	113,40			48,00	98,40			110,30	106,10		

**ANHANG-TABELLE 26: PROTEINBIOMARKER KIM1, OPN, CLU UND CYSC IM ZSF1-TIERMODELL, SOWIE KREATININGEHALT DES URINS FÜR NORMALISIERUNG DER PROTEINBIOMARKER UND miRNA**

Quantifizierung der Proteinbiomarker KIM-1, OPN, CYSC und CLU im Urin von 14, 22 und 26 Wochen alten, fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten mittels Mesoscale (Schlank W14: n=3, weitere Endpunkte: n=4). Die Proteinbiomarker im Urin wurden auf den angegebenen Kreatiningehalt im Urin normalisiert. Es sind die Rohdaten sowie die relativen arithmetischen Mittelwerte einschließlich Standardabweichung in fettleibigen ZSF1-Ratten verglichen zur gleichaltrigen schlanken Kontrolle dargestellt. Absolute Werte für Kreatinin sind in der Einheit mmol/l, die Proteinbiomarker in der Einheit ng/ml angegeben. Zudem ist die relative Genexpression von KIM-1, OPN, CYSC und CLU im Nierenhomogenat gezeigt, welche mittels Mikroarray bestimmt wurde (wk14: n=5, wk26: n=10). UCrea Norm.: Normalisierung auf Kreatinin im Urin. KIM-1: Kidney Injury Molecule-1. OPN: Osteopontin. CYSC: Cystatin C. CLU: Clusterin. OvL: Fettleibig verglichen zu schlanken Kontrolle.

	Urin					Nierengewebe (mRNA)							
	ZSF1 fettleibig (Rohdaten)		ZSF1 schlank (Rohdaten)		ZSF OvL incl. UCrea Norm.	ZSF fettleibig vs. schlank							
<b>Kreatinin</b>													
Woche 14	3,40	4,55	3,46	6,74	14,30								
		2,83		13,89	9,92								
Woche 22	3,25	2,99	2,90	9,44	7,95								
		4,10		8,01	7,90								
Woche 26	3,30	4,00	3,22	10,07	12,07								
		3,19		8,80	9,52								
<b>KIM-1</b>													
Woche 14	1,42	1,13	0,85	0,85	6,00	3,57	15,13	47,20	12,32	41,53	11,75		
	0,93	1,30	0,87		3,87	6,63							
Woche 26	1,88	1,62	0,65	0,66	8,70	6,18	25,52	36,73	55,52	41,33	30,82		
	2,57	2,12	0,63	0,68	12,19	10,16	41,88	34,00	51,94	32,99	17,24		
<b>OPN</b>													
Woche 14	53,20	55,72	65,76	67,43	2,85	2,23	9,37	11,21	6,48	9,88	6,20		
	54,73	57,41	69,44		2,88	3,70							
Woche 26	46,04	47,05	61,09	68,34	2,16	1,82	12,51	15,07	25,55	21,45	20,35		
	47,97	49,82	65,27	63,76	2,31	2,42	24,05	18,56	23,13	15,65	13,70		
<b>CLU</b>													
Woche 14	480,24	469,04	468,38	466,69	3,76	2,74	2,29	6,63	3,48	3,87	2,97		
	482,39	466,07	460,02		3,71	4,38							
Woche 26	476,79	472,97	470,26	466,00	3,14	2,57	3,32	7,39	6,20	6,21	6,40	9,50	7,50
	482,81	461,99	464,50	435,06	3,26	3,15			10,78	4,84	5,11		
<b>CYSC</b>													
Woche 14	100,55	92,028	47,70		6,39	4,37	1,54	1,10	1,09	1,43	1,10		
	101,04	125,24	64,33		6,31	9,56							
			58,69										
Woche 26	124,20	132,11	76,98	70,24	6,10	5,36	1,27	1,43	1,61	1,73	2,15	1,38	1,47
	130,69	127,19	55,87	46,18	6,58	6,47			1,56	1,55	1,65		

**ANHANG-TABELLE 27: ANZAHL SIGNIFIKANT DEREGULIERTER GENE IN HERZ, NIERE UND LEBER IM ZSF1- UND mRENTG-RATTENMODELL UND IN NTS- UND AA-BEHANDELTEN RATTEN**

Signifikant veränderte Expression von Genen in mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME oder Captopril und in SD-Ratten mit und ohne L-NAME-Behandlung (n=5), sowie in fettleibigen und schlanken 14, 22, 26, 46 und 59 Wochen alten ZSF1-Tieren (W14/22: n=5; W26: n=10; W46: n=4; W59: n=6). Die Daten wurden mit publizierten Datensätzen zu AA- und GN-induzierter Nephropathie in Ratten verglichen (Pavkovic et al. 2015a; Su et al. 2011). mRNA-Profile wurden mit Hilfe von Affymetrix Mikroarrays bestimmt. Es ist die Anzahl signifikant veränderter Gene in erkrankten Tieren relativ zur entsprechenden Kontrolle dargestellt. Eine detaillierte Darstellung der Signifikanztestung ist in den Abbildungen 9, 10 und 14 dargestellt. mRenTG: Maus Renin-transgen.

SD: Sprague-Dawley-Ratte. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester. W: Woche. OvL: Fettleibig verglichen zu schlanker Kontrolle. Capto: Captopril. GN: Glomerulonephritis. ND: Niedrige Dosis. MD: Mittlere Dosis. HD: Hohe Dosis. AA: Aristolochiasäure.

	Niere	Herz	Leber
ZSF1 OvL (W14)	338	/	/
ZSF1 OvL (W22)	383	56	683
ZSF1 OvL (W26)	441	133	630
ZSF1 OvL (W46)	2162	96	513
ZSF1 OvL (W59)	3173	94	321
SD + L-NAME vs. SD	11	8	/
mRenTG + Captopril vs. SD	155	86	/
mRenTG + L-NAME vs. SD	681	477	/
mRenTG + L-NAME vs. mRenTG + Captopril	764	326	/
GN - ND	29	/	/
GN - MD	154	/	/
GN - HD	510	/	/
AA	1256	/	/

#### ANHANG-TABELLE 28: DENSIOMETRISCHE ANALYSE DES EV-WESTERN BLOTS

Rohdaten der densitometrische Analyse des Western Blots der exosomalen Proteine TSG101 und Alix, des mikrovesikulären Proteins Calnexin und des Gesamtproteins in EV-angereicherten Urinproben oder Gesamturin (4 Tiere gepoolt) von fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten (Alter: 26 Wochen). EVs wurden mittels des miRCURY Exosome Isolation Kits oder qEV-Säulen (Fraktionen 7 bis 10) isoliert. Je 16,25  $\mu$ L EV-Probe (aus 1 ml Urin) oder 100  $\mu$ L Gesamturin wurden verwendet. Der Gesamtproteingehalt wurde mit Hilfe von Intensitätsbestimmung aller Banden pro Probe nach Coomassie-basierter Proteinfärbung und einem BCA-Assay bestimmt. EV: Extrazelluläre Vesikel. Fr: Elutionsfraktion. SEC: Größenausschlusschromatographie. BCA: Bicinchoninsäure.

	Densitometrische Analyse				BCA-Test
	TSG101	Calnexin	Alix	Gesamtprotein	Gesamtprotein [ $\mu$ g/ml]
<b>Methodenvergleich</b>					
miRCURY	8219,35	6954,55	3647,42	46745,12	867,93
SEC Fr. 7	/	/	/	41555,98	Unter der Detektionsgrenze
SEC Fr. 8	2213,84	3512,72	1446,06	41453,69	
SEC Fr. 9	1958,57	2940,12	1118,54	40826,53	
SEC Fr. 10	/	3060,28	/	40249,88	
Hintergrund	1685,35	2428,78	883,54	39445,02	0
<b>ZSF1</b>					
Fettleibig Gesamturin	2370,20	1315,93	1295,54	39049,00	/
Fettleibig EV	5460,43	3539,68	2683,39	33993,06	/
Schlank EV	4930,29	1894,55	2218,55	32987,89	/
Hintergrund	1064,20	906,70	779,71	27898,83	/

#### ANHANG-TABELLE 29: VERWENDETE ASSAYS DER FIRMA QIAGEN FÜR DIE *IN VITRO* UND *IN VIVO* QUANTIFIZIERUNG VON MIRNAS

MiRCURY Assay Katalognummer	miRNA Bezeichnung	Zielsequenz
YP00205198	mmu-miR-295-5p	ACUCAAAUGUGGGGCACACUUC
YP00205304	mmu-miR-1188-5p	UGGUGUGAGGUUGGGCCAGGA
YP00204130	hsa-miR-135b-5p	UAUGGCUUUUCUUCUAUGUGA
YP00204427	hsa-miR-135b-3p	AUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGG
YP00204494	hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC
YP00204536	hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUGGUUA
YP00204124	hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
YP00205627	hsa-let-7d-3p	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU
YP00204715	hsa-miR-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
YP00205451	mmu-miR-674-5p	GCACUGAGAUGGGAGUGGUGUA
YP00205452	mmu-miR-674-3p	CACAGCUCCAUCUCAGAACAA
YP00204772	hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
YP00205631	hsa-miR-23a-5p	GGGGUUCUUGGGGAUGGGUUU
YP00205935	hsa-miR-499a-5p	UUAAGACUUGCAGUGAGUUU
YP00204438	hsa-miR-499a-3p	AACAUCACAGCAAGUCUGUGCU

YP00204037	mmu-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG
YP00205162	mmu-miR-139-3p	UGGAGACGCGGCCUGUUGGAG
YP00204750	hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUUGUGGGUU
YP00205653	hsa-let-7b-3p	CUAUACAACCUACUGCCUUC
YP00204490	hsa-miR-708-5p	AAGGAGCUUACAAUCUAGCUGGG
YP00204681	hsa-miR-708-3p	CAACUAGACUGUGAGCUUCUAG
YP00204737	hsa-miR-431-5p	UGUCUUGCAGGCCGUGAUGCA
YP00204481	hsa-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
YP00206035	hsa-miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG
YP00204552	hsa-miR-132-5p	ACCGUGGCUUUCGAAUUGUACU
YP00206007	hsa-miR-339-5p	UCCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG
YP00204483	hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU
YP00205204	mmu-miR-101a-5p	UCAGUUAUCACAGUGCUGAUGC
YP00205521	rno-miR-301a-5p	GCUCUGACUUUUAUUGCACUAC
YP00205035	mmu-miR-488-3p	UUGAAAGGCUGUUUCUUGGUC
YP00205502	rno-miR-135a-3p	UGUAGGGAUGGAAGCCAUGAAA
YP00204122	hsa-miR-1249-3p	ACGCCUUCUCCCCUUCUUACA
YP00205504	rno-miR-196c-5p	UAGGUAGUUUCGUGUUGUUGGG
YP00204788	hsa-miR-133a-3p	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
YP00205501	hsa-miR-133a-5p	AGCUGGUAAAAUGGAACCAAU
YP00205066	mmu-miR-300-3p	UAUGCAAGGGAAGCUCUCUUC
YP00205412	mmu-miR-300-5p	UUGAAGAGAGGUUAUCCUUGU
YP00205525	rno-miR-336-5p	UCACCCUCCAUAUCUAGUCU
YP00204057	hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU
YP00204278	hsa-miR-323a-3p	CACAUUACACGGUCGACCUCU
YP00206080	hsa-miR-323a-5p	AGGUGGUCCGUGGCGGUUCGC
YP00204230	hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
YP00205574	rno-miR-802-5p	UCAGUAACAAAGAUUCAUCCU
YP00205419	mmu-miR-330-3p	GCAAAGCACAGGGCCUGCAGAGA
YP00204363	hsa-miR-455-5p	UAUGUGCCUUUGGACUACAUCG
YP00203954	UniSp6	
YP00204394	hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
YP00204247	hsa-let-7i-3p	CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU
YP00205562	rno-miR-653-5p	UUGAAACAUUCUCUACUGAAC
YP00205058	mmu-miR-376b-3p	AUCAUAGAGGAACAUCCACUU
YP00205199	mmu-miR-376b-5p	GUGGAUAUUCUUAUGGUUA
YP00205424	mmu-miR-34c-3p	AAUCACUAACCACACAGCCAGG
YP00205981	hsa-miR-488-5p	CCCAGAUAAUGGCACUCUCAA
YP00204042	hsa-miR-410-3p	AAUUAUACACAGAGUCCUGU
YP00205497	rno-let-7f-1-3p	CUAUACAUAUCUUAUGCCUUC
YP00206068	hsa-miR-340-5p	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU
YP00205182	mmu-miR-322-5p	CAGCAGCAAUUCUUGUUUGGA
YP00204018	hsa-miR-187-3p	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG
YP00204778	hsa-miR-10a-5p	UACCCUGUAGAUCCGAUUUGUG
YP00205688	hsa-miR-10a-3p	CAAUUCGUUUCUAGGGAAUA
YP00204361	hsa-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUCGGCUGA
YP00205115	rno-miR-20b-3p	ACUGCAGUGUGAGCACUUCUGG
YP00205110	rno-miR-190b-5p	UGAUUUGUUUGAUUUAGGUU
YP00205146	rno-miR-598-5p	GCGGUGAUGCCGAUGGUGCGAG
YP00204783	hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC
YP00205707	hsa-miR-30c-1-3p	CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC
YP00205108	rno-miR-148b-5p	GAAGUUCUGUUUACACUCAGG
YP00205884	hsa-miR-106b-5p	UAAAGUGCUGACAGUCAGAU
YP00204020	hsa-miR-106b-3p	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC
YP00205689	hsa-miR-100-5p	AACCCGUAGAUCGGAACUUGUG
YP00204549	hsa-miR-760	CGGCUCUGGGUCUGUGGGGA
YP00204518	hsa-miR-154-5p	UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCG
YP00204096	hsa-miR-154-3p	AAUCAUACACGGUUGACCUAUU
YP00205586	mmu-let-7a-1-3p	CUAUACAUAUCUACUGCUUUC
YP00205417	mmu-miR-325-5p	CCUAGUAGGUGCUCAGUAAGUGU
YP00205088	mmu-miR-325-3p	UUUUAUUGAGCACCUCCUUAUCAA
YP00205636	hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGAU
YP00205531	rno-miR-349	CAGCCCUGCUGUCUUAACCUCU
YP00205540	rno-miR-381-3p	UAUACAAGGGCAAGCUCU
YP00204513	hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
YP00204620	hsa-miR-9-3p	AUAAAGCUAGUAACCGAAAGU
YP00205091	mmu-miR-211-5p	UCCCCUUGUCAUCCUUGCCU
YP00205702	hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGCG
YP00205554	rno-miR-501-5p	AAUCCUUUGUCCCUGGGUGA

YP00204540	hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
YP00204304	hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGG
YP00204173	hsa-miR-363-5p	CGGGUGGAUCACGAUCCAAUUU
YP00205578	rno-miR-881-3p	UAACUGUGGCAUUUCUGAAUAG
YP00205059	mmu-miR-376a-3p	AUCGUAGAGGAAAAUCCACGU
YP00204688	hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUJCCAUGGGUU
YP00205515	rno-miR-24-1-5p	GUGCCUACUGAGCUGAUUCAG
YP00204436	hsa-miR-296-5p	AGGGCCCCCCUCAAUCCUGU
YP00204393	hsa-miR-296-3p	GAGGGUJGGGUGGAGGCUCUC
YP00205159	mmu-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUG
YP00205415	mmu-miR-31-3p	UGCUAUGCCAACAUUUUGCCAUC
YP00205626	hsa-miR-877-5p	GUAGAGGAGAUJGGCGCAGGG
YP00205547	rno-miR-463-3p	UGAUAGACGCCAAUUJGGGUAG
YP00206046	hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGGCUAUCCUAGAA
YP00205639	hsa-miR-218-2-3p	CAUGGUUCUGUCAAGCACCGCG
YP00205566	rno-miR-673-5p	CUCACAGCUCGGUCCUJGGAG
YP00204347	hsa-miR-378a-5p	CUCCUGACUCCAGGUCCUGUGU
YP00205073	mmu-miR-362-5p	AAUCCUJGGAAACCUJAGGUAGAAU
YP00205012	mmu-miR-362-3p	AACACACCUGUJCAAGGAUJCA
YP00204368	hsa-miR-147b	GUGUGCGGAAAUGCUCUJGCUA
YP00205727	hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUJAGGUJGUJAGUU
YP00205129	rno-miR-345-5p	UGCUGACCCCUJAGUCCAGUGC
YP00205529	rno-miR-345-3p	CCCUGAACUJAGGGGUCUJGGAGA
YP00206073	hsa-miR-206	JGGAAUGUJAGGAAGUJAGUJGG
YP00204606	hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUJUGAAGAACUGU
YP00204255	hsa-miR-22-5p	AGUUCUJAGUJGGCAAGCUJUA
YP00204530	hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUJGCUJGUCGGUJGGU
YP00205538	rno-miR-377-3p	UGAAUCACACAAJAGGCAACUJUUU
YP00205656	hsa-miR-539-5p	JGAGAAAUJAUCCUJUGGUGUGU
YP00205498	rno-miR-1-5p	JCACAUACUUCUJUUJAGUJACCC
YP00205481	mmu-miR-872-5p	AAGGUACUJGUJAGUJUCAGG
YP00205482	mmu-miR-872-3p	UGAACUJAUJGCGAGUJGCCU
YP00204322	hsa-miR-28-5p	AAGGAGCUCACAGUCUJAUJGAG
YP00204119	hsa-miR-28-3p	CACUJAGAUJGUGAGCUCUJGGA
YP00205079	mmu-miR-384-3p	AUJCCUJAGAAAUJGUJCCAAU
YP00205189	mmu-miR-384-5p	UGUAAACAAUJCCUJAGGCAUJGU
YP00204172	hsa-miR-26b-5p	UJCAAGUAAUJAGGAUJAGGU
YP00204117	hsa-miR-26b-3p	CCUGUUCUCCAUJACUJUGGCUC
YP00206081	hsa-miR-181a-5p	AACAUJCAACGCGUJGCGGAGU
YP00204110	hsa-miR-181a-3p	ACCAUCGACCGUJUGAUJGUJACC
YP00205510	rno-miR-20a-3p	ACUGCAUJACGAGCACUJACA
YP00206041	rno-miR-291a-3p	AAAGUGCUJCCACUJUUJGUGJGCC
YP00205569	rno-miR-743a-3p	GAAAGACGCCAAACUJGGGUJAGA
YP00205107	rno-miR-146b-5p	UGAGAACUGAAUJCCAUJAGGCUGU
YP00206053	hsa-miR-186-5p	CAAAGAAUJUCUCCUJUUJUGGCUC
YP00205995	hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCUGGUCUJUU
YP00205549	rno-miR-466b-5p	UAUGUGUGUGUGUJAGUJCCAUG
YP00204003	hsa-miR-532-3p	CCUCCACACCCAAGGCUJUGCA
YP00204169	hsa-miR-382-5p	GAAGUJGUJCGUGGUGGAUJCG
YP00206066	hsa-miR-382-3p	AAUCAUJACGGACAACACUJ
YP00205558	rno-miR-540-3p	AGGUCAGAGGUCGAUCCUJGGGC
YP00205585	mmu-miR-196a-2-3p	UCGGCAACAAGAAACUJGCCUGA
YP00205507	rno-miR-202-5p	UJCCUJAGCAUJACUJUCU
YP00206026	hsa-miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUJGCC
YP00204266	hsa-miR-124-5p	CGUGUJACAGCGGACCUJGAU
YP00205711	hsa-let-7e-5p	UGAGGUJAGGAGGUJGUJAGUU
YP00205301	hsa-let-7e-3p	CUJAUJACGGCCUCCUJAGCUJUCC
YP00205978	hsa-miR-875-5p	UJAUJCCUCAGUJUUJAUJAGGUG
YP00205075	mmu-miR-34b-5p	AGGCAGUGUJAAUJAGCUGAUJGU
YP00205086	mmu-miR-34b-3p	AAUCACUJACUCCACUJGCCAUC
YP00204337	hsa-miR-425-5p	AAUGACACGAUCACUCCCGUJGA
YP00205719	rno-miR-350	UJCACAAAGCCCAUJACAUJUCAC
YP02119288	UniSp3	
YP00205475	hsa-miR-761	JCAGCAGGGUGAAACUJGACACA
YP00205183	mmu-miR-329-3p	AACACACCCAGCUJACCUJUUUU
YP00205092	mmu-miR-298-5p	JGCAGAGGAGGGCUGUJCUJCC
YP00206027	rno-miR-290	UCUCAAAACUJAGGGGCA
YP00205319	mmu-miR-130b-5p	ACUCUJUCUCCUGUJUGCACUJACU
YP00205175	mmu-miR-191-3p	JCUGCACUJGGAUJUCGUJCCC

YP00205093	mmu-miR-500-3p	AAUGCACCUGGGCAAGGGUUCA
YP00205049	mmu-miR-668-3p	UGUCACUCGGCUCGGCCACUACC
YP00204338	hsa-miR-153-3p	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC
YP00204417	hsa-miR-96-5p	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU
YP00204289	hsa-miR-216b-5p	AAAUCUCUGCAGGCAAUGUGA
YP00206028	hsa-miR-369-3p	AAUAAUACAUGGUUGAUCUUU
YP00206014	hsa-miR-369-5p	AGAUCGACCGUGUUUAUUUCGC
YP00205302	mmu-let-7f-2-3p	CUAUACAGUCUACUGUCUUUC
YP00204754	hsa-miR-144-3p	UACAGUAUAGAUGAUGUACU
YP00205149	rno-miR-99a-3p	CAAGCUCGUUUUCUAUGGGUCUG
YP00204063	hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
YP00205695	hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
YP00204457	hsa-miR-30a-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC
YP00205492	mmu-miR-883b-3p	UAACUGCAACAUCUCUCAGUUAU
YP00205503	hsa-miR-136-3p	CAUCAUCGUCUCAAUAGAGUCU
YP00204306	hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG
YP00204767	hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU
YP00205202	hsa-let-7c-3p	CUGUACAACCUUCUAGCUUUCC
YP00204780	hsa-miR-219a-5p	UGAUUGUCCAAACGCAAUUUCU
YP00204532	hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
YP00205170	mmu-miR-672-5p	UGAGGUUGGUGUACUGUGUGUGA
YP00204317	hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
YP00205625	hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU
YP00205118	mmu-miR-219a-1-3p	AGAGUUGCGUCUGGACGUCCCG
YP00205983	hsa-miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCACCUUGCG
YP00204064	hsa-miR-99b-3p	CAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCG
YP00205239	mmu-miR-742-5p	UACUCACAUGGUUGCUAAUCA
YP00204763	hsa-miR-190a-5p	UGAUUUGUUUGAUUAUUUAGGU
YP00205583	rno-miR-17-1-3p	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUGG
YP00205537	rno-miR-376a-5p	GGUAGAUUCUCCUUCUAUGAG
YP00205535	rno-miR-352	AGAGUAGUAGGUUGCAUAGUA
YP00205089	mmu-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACCG
YP00204243	hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
YP00205898	hsa-miR-15b-3p	CGAAUCAUUUUUGCUGCUCUA
YP00205632	hsa-miR-30c-2-3p	CUGGGAGAAGGCUGUUUACUCU
YP00206038	hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG
YP00206021	hsa-miR-27a-5p	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA
YP00204386	hsa-miR-196a-5p	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUUGG
YP00205559	rno-miR-543-3p	AAACAUUCGCGGUGCUUUUCU
YP00205987	mmu-miR-376c-3p	AACAUAGAGGAAAUUUCACGU
YP00205555	rno-miR-504	AGACCCUGGUCUGCACUCUGUC
YP00205524	rno-miR-327	CCUUGAGGGGCAUGAGGGU
YP00206025	mmu-miR-676-3p	CCGUCCUGAGGUUGUUGAGCU
YP00205664	hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
YP00205063	mmu-miR-291a-5p	CAUCAAGUGGAGGCCUCUCU
YP00204640	hsa-miR-98-5p	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUUGU
YP00205726	mmu-miR-449c-5p	AGGCAGUGCAUUGCUAGCUGG
YP00204790	hsa-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
YP00205553	rno-miR-489-3p	AUGACAUCACAUUAUUGGCAGC
YP00204722	hsa-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
YP00204291	hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
YP00206054	hsa-miR-361-5p	UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUAC
YP00205974	rno-miR-208a-3p	AUAAGACGAGCAAAAAGC
YP00204674	hsa-miR-219a-2-3p	AGAAUUGUGGCUGGACAUCUGU
YP00205526	rno-miR-343	UCUCCCUCGUGUGCCCAGA
YP00204714	hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG
YP00204410	hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
YP00204144	hsa-miR-200b-5p	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA
YP00205120	rno-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC
YP00206015	hsa-miR-495-3p	AAACAACAUGGUGCACUUCUU
YP00204544	hsa-miR-299-5p	UGGUUUACCGUCCACAUACAU
YP00205997	rno-miR-876	UGGAUUUCUCUGUGAAUCACCA
YP00204167	hsa-miR-216a-5p	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA
YP00204601	hsa-miR-184	UGGACGGAGAACUGAUUAGGGU
YP00204207	hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG
YP00204339	hsa-miR-125a-5p	UCCCUGAGACCCUUUAACUGUGA
YP00204446	hsa-miR-125a-3p	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC
YP00204789	hsa-miR-181d-5p	AACAUUCAUUGUUGUCGGGGU
YP00205658	hsa-miR-379-5p	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG

YP00204551	hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
YP00205548	rno-miR-465-5p	UAUUUAGAACGGUGUGUGUG
YP00204679	hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAUUCAGUGU
YP00204761	hsa-miR-874-3p	CUGCCCUGGCCCGAGGGACCGA
YP00204372	hsa-miR-330-5p	UCUCUGGGCCUGUGUCUUAGGC
YP00205428	hsa-miR-377-5p	AGAGGUUGCCCUUGGUGAAUUC
YP00204468	hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC
YP00204387	hsa-miR-652-3p	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG
YP00205136	rno-miR-421-5p	GGCCUCAUJAAAUGUUUGUUG
YP00205143	rno-miR-505-3p	GUCAACACUUGCUGGUUUCC
YP00206058	hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA
YP00204488	hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU
YP00204755	hsa-miR-20b-5p	CAAAGUGCUCUAGUGCAGGUAG
YP00204765	hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCUACACUCAGCU
YP00205561	rno-miR-632	GUGUCUGUUUCCUGCCGGA
YP00204531	hsa-miR-411-5p	UAGUAGACCGUAUAGCGUACG
YP00204489	hsa-miR-487b-3p	AAUCGUACAGGGUUAUCCACU
YP00204014	hsa-miR-409-5p	AGGUUACCCGAGCAACUUUGCAU
YP00205190	mmu-miR-434-3p	UUUGAACCAUCACUCGACUCCU
YP00205499	rno-miR-10b-5p	CCCUGUAGAACCGAAUUUGUGU
YP00206034	hsa-miR-218-5p	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU
YP00205877	hsa-miR-7-5p	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU
YP00205126	rno-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGA
YP00205570	rno-miR-743b-3p	GAAAGACACCAUACUGAAUAGA
YP00205527	rno-miR-344a-3p	UGAUCUAGCCAAAGCCUAGCUGU
YP00205528	rno-miR-344a-5p	UCAGGCUCUUGGCUAGAUU
YP02119300	hsa-miR-568	AUGUAUAAAUGUAUACACAC
YP00205713	hsa-miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
YP00204400	hsa-miR-125b-1-3p	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU
YP00205914	hsa-miR-203a-3p	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG
YP00205544	rno-miR-409a-3p	AAUGUUGCUCGGUAGACCCC
YP00206042	hsa-miR-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA
YP00205176	mmu-miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCAAGAUGA
YP00204504	hsa-miR-141-3p	UACACUGUCUGGUAAAGAUGG
YP00206010	hsa-miR-126-5p	CAUUUUUACUUUUUGGUACGCG
YP00204227	hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUUAUGCG
YP00205539	rno-miR-379-3p	CUAUGUAACAUGGUCCACUAAC
YP00206030	hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU
YP02119303	mmu-miR-155-5p	UUAUUGCUAAUUGUAGUAGGGGU
YP00204762	hsa-miR-135a-5p	UAUGGCUUUUUUAUCCUAUGUGA
YP00205187	mmu-miR-326-3p	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAGU
YP00204786	hsa-miR-101-3p	UACAGUACUGUGUAACUGAA
YP00205999	hsa-miR-490-3p	CAACCUUGGAGGACUCCAUGCUG
YP00206077	hsa-miR-490-5p	CCAUGGAUCUCCAGGUGGGU
YP00205543	rno-miR-383-5p	CAGAUCAGAAGGUGAGUGUGG
YP00205500	rno-miR-125b-2-3p	ACAAGUCAGGCUCUUGGGACCU
YP00205721	rno-miR-215	AUGACCUAUGAUUUUGACAGACA
YP00204660	hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG
YP00205508	rno-miR-204-3p	GCUGGGAAGGCAAAGGGACGUU
YP00204024	hsa-miR-671-3p	UCCGGUUCUCAGGGCUCACC
YP00205111	rno-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGAC
YP00205601	hsa-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAGC
YP00205557	rno-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACUGU
YP00204384	hsa-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCCGCCUCC
YP00205094	mmu-miR-503-5p	UAGCAGCGGGAACAGUACUGCAG
YP00205185	mmu-miR-342-5p	AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAG
YP00204450	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA
YP00205573	rno-miR-7a-1-3p	ACAACAAUACACAGUCUGCCA
YP00204698	hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAUUCGGUUA
YP00204430	hsa-miR-29a-5p	ACUGAUUUUCUUUGGUGUUCAG
YP00203952	cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGUCUUG
YP00205444	hsa-miR-542-3p	UGUGACAGAUUGAUAAUCUGAAA
YP00204362	hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
YP00205127	rno-miR-339-3p	UGAGCGCCUCGACGACAGAGCCA
YP00205161	mmu-miR-138-1-3p	CGGCUACUUCACAACACCAGGG
YP00204486	hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
YP00205040	mmu-miR-542-5p	CUCGGGGAUCAUCAUGACACGA
YP00205512	rno-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAG
YP00204487	hsa-miR-205-5p	UCCUUAUUCACCGGAGUCUG

YP00204239	hsa-miR-188-5p	CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGG
YP00205947	mmu-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCCGGCCUG
YP00204555	hsa-miR-196b-5p	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG
YP00204364	hsa-miR-328-3p	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU
YP00204166	hsa-miR-493-5p	UUGUACAUGGUAGGCUUUCAUU
YP00205915	hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
YP00204707	hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
YP02119304	hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
YP02105863	rno-miR-185-3p	UUUCCUCUGGUCCUUCUCU
YP00204683	hsa-miR-181c-5p	AACAUUCAACCCUGUCGGUGAGU
YP00206045	hsa-let-7a-2-3p	CUGUACAGCCUCCUAGCUUUC
YP00205564	rno-miR-666-5p	AGCGGGCACGGCUGUGAGAG
YP00204080	hsa-miR-194-5p	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA
YP00204353	hsa-miR-758-3p	UUUGUGACCUGGUCCACUAACC
YP00205565	rno-miR-667-3p	UGACACCUGCCACCCAGCCCAA
YP00204622	hsa-miR-365a-3p	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUUAU
YP00204729	hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
YP00204132	hsa-miR-29c-5p	UGACCGAUUUCUCCUGGUUUC
YP00205530	rno-miR-347	UGUCCUCUGGGUCGCCCA
YP00205551	rno-miR-483-3p	CACUCCUCCCCUCCCGUCUUGU
YP00205106	rno-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCU
YP00204036	hsa-miR-433-3p	AUCAUGAUGGGCUCUCCUGGUGU
YP00205430	hsa-miR-433-5p	UACGGUGAGCCUGUCAUUUJUC
YP00205862	hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUUCUUGCAAAACUGA
YP00206047	hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG
YP00204023	hsa-miR-30d-3p	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGC
YP00204294	hsa-miR-152-3p	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG
YP00205327	mmu-miR-1839-5p	AAGGUAGAUAGAACAGGUUCUUG
YP00204792	hsa-miR-32-5p	UAUUGCACAUUACUAAGUUGCA
YP00206078	hsa-miR-138-5p	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG
YP00205520	rno-miR-29b-1-5p	UUUCAUAUGGUGUUUAGAUUU
YP00205550	rno-miR-466c-5p	UGUGAUGUGUGUAUGUACUAG
YP00204608	hsa-miR-374b-5p	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG
YP00205563	rno-miR-665	ACCAGGAGGCUGAGGUCCUUA
YP00205989	hsa-miR-134-5p	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG
YP00205130	rno-miR-346	UGUCUGCCUGAGUGCCUGCCUCU
YP00204208	hsa-miR-29b-2-5p	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG
YP00205576	rno-miR-878	GCAUGACACCAUACUUGGGUAGA
YP00204099	hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
YP02119305	hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUCUGAGUU
YP00205065	mmu-miR-301b-3p	CAGUGCAAUGGUUUUGUCAAAAGC
YP00205579	hsa-miR-935	CCAGUUACCGCUUCCGCUACCGC
YP00205505	rno-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGUAAUUGAUG
YP00205128	rno-miR-340-3p	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGCC
YP00205568	rno-miR-742-3p	GAAAGCCACCAUGUUGGGUAAA
YP02119293	hsa-miR-335-5p	UCAAGAGCAAUAACGAAAAUUGU
YP00204292	hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUUAJAGUCAGGUAG
YP00204007	hsa-miR-151a-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU
YP00206062	hsa-miR-137	UUUUUGCUUAGAAUACGCGUAG
YP00204333	hsa-miR-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
YP00204591	hsa-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAAGUCCAGU
YP00204359	hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
YP00204643	hsa-miR-448	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCCAU
YP00205571	rno-miR-760-5p	CCCCUCAGGCCACCAGAGCCCG
YP00204445	hsa-miR-615-5p	GGGGGUCCCCGGUGCUCGGAUC
YP00205725	mmu-miR-541-5p	AAGGGAUUCUGAUGUUGGUCACACU
YP00205068	mmu-miR-429-3p	UAAUACUGUCUGGUAUUGCCGU
YP00204047	hsa-miR-148b-3p	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
YP00206022	mmu-miR-212-3p	UACAGUCUCCAGUCACGGCCA
YP00205659	hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC
YP00205516	rno-miR-25-5p	AGGCGGAGACACGGGCAUUGC
YP00206072	hsa-miR-204-5p	UUCCCUUUGUCAUCCUUAUGCCU
YP00204260	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
YP00205522	rno-miR-322-3p	AAACAUGAAGCGCUGCAACA
YP00205506	rno-miR-201-5p	CACUCAGUAAGGCAUUGUUC
YP00205546	rno-miR-450a-5p	UUUUGCGAUGUGUCCUAAUGU
YP00205567	rno-miR-678	GUCUCGGGGCAAGGACUGGAGG
YP00204658	hsa-miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU
YP00206023	hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU

YP00206075	hsa-miR-381-5p	AGCGAGGUUGCCCUUUGUAUUAU
YP00205400	mmu-miR-21a-3p	CAACAGCAGUCGAUUGGGCUGUC
YP00205045	mmu-miR-598-3p	UACGUCAUCGUCGUCUACGUGUA
YP00205072	mmu-miR-101b-3p	GUACAGUACUGUGAUAGCU
YP00205398	hsa-miR-208a-5p	GAGCUUUUGGCCCGGGUUUAUAC
YP00204114	hsa-miR-338-5p	AACAAUAUCCUGGUGCUGAGUG
YP00206000	hsa-miR-759	GCAGAGUGCAAACAAUUUUGAC
YP00205523	rno-miR-324-3p	CCACUGCCCCAGGUGCUGCUGG
YP00205869	hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC
YP00205163	mmu-miR-151-3p	CUAGACUGAGGCUCUUUGAGG
YP00205479	mmu-miR-770-5p	AGCACCACGUGUCUGGGCCACG
YP00206067	hsa-miR-129-2-3p	AAGCCCUUACCCCAAAAAGCAU
YP00204521	hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG
YP00204534	hsa-miR-129-5p	CUUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
YP00205723	rno-miR-582-5p	UACAGUUGUUAACCAGUUACU
YP00205514	rno-miR-224-5p	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUU
YP00205690	hsa-miR-33a-5p	GUGCAUUGUAGUUGUACUGCA
YP00205556	rno-miR-511-5p	CAUGCCUUUUGCUCUGCUCUC
YP00205534	rno-miR-351-5p	UCCCUGAGGAGCCCUUUGAGCCUGA
YP00205164	mmu-miR-497a-5p	CAGCAGCACACUGUGUUUGUA
YP00204779	hsa-miR-136-5p	ACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGGA

### ANHANG-TABELLE 30: ROHDATEN DES EV-MIRNA-PROFILING IM URIN VON ZSF1

Rohdaten der miRNA-Quantifizierung in Urin-EVs fettleibiger und schlanker ZSF1-Ratten im Alter von 14, 22 oder 26 Wochen (n=4). Gezeigt sind Ct-Werte. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten mit 374 miRNA-Assays und interne Kontrollen (Qiagen) quantifiziert. EV: Extrazelluläre Vesikel. miR: microRNA.

miRNAs	EV-Profilung						Gesamturin-Profilung		
	Fettleibig (EVs)			Schlank (EVs)	Fettleibig (Gesamturin)		Fettleibig		Schlank
	Woche 14	Woche 22	Woche 26	Woche 22	Woche 22	Woche 22	Woche 14	Woche 26	Woche 26
miR-295-5p	34,1 35,4 34,7 34,8	35,2 33,2 34,8 31,9	34,7 34,8 34,0 34,8	35,4 34,2 35,2 34,8	/ 35,2 / 35,0	/ / / /	/ / / /	37,8 38,9 / 36,2	/ / / /
miR-1188-5p	35,4 36,0 / 35,4	36,2 34,9 / 35,3	/ 35,2 35,4 /	36,2 39,8 38,8 /	35,4 33,7 / 35,0	38,5 / 39,5 /	/ / 38,0 38,2	/ / 38,2 /	/ / 38,2 /
miR-135b-5p	33,2 32,2 34,4 33,4	33,7 32,8 33,5 32,0	33,0 32,4 32,7 32,1	32,9 33,0 33,3 34,4	34,5 35,3 35,1 34,7	37,5 36,8 36,0 /	38,8 35,5 37,9 35,1	35,4 38,0 37,7 38,2	35,4 38,0 37,7 38,2
miR-135b-3p	/ / / 36,6	/ / / 37,1	/ 35,7 / /	/ / / /	/ 38,1 / /	/ / 35,3 /	/ / / /	/ / / /	38,7 / / /
miR-199a-5p	/ 37,9 36,7 35,8	/ 39,3 / 31,9	37,6 / 35,5 /	/ / / 36,1	35,5 35,4 / /	/ / 35,1 /	38,2 35,0 39,1 35,5	37,9 / 35,3 /	37,9 / 35,3 /
miR-199a-3p	35,5 34,6 35,3 35,5	33,8 35,4 35,5 34,2	35,6 35,3 34,6 32,9	35,3 35,0 34,5 35,2	33,6 35,0 34,9 35,5	34,9 34,9 / 35,0	35,3 35,3 34,7 35,2	/ 34,9 34,9 /	/ 34,9 34,9 /
let-7d-5p	26,4 25,3 26,6 26,0	26,0 25,8 26,3 25,4	25,8 25,0 25,1 25,9	25,5 26,3 25,6 26,1	27,0 26,9 27,7 26,4	29,2 29,7 30,4 30,0	28,9 28,9 29,6 28,1	29,9 30,0 30,4 29,7	29,9 30,0 30,4 29,7
let-7d-3p	26,1 25,6 26,4 26,4	25,9 26,1 26,2 25,6	26,2 25,5 26,1 26,0	25,3 5,8 25,2 26,0	27,2 27,1 27,8 26,9	29,4 29,8 30,3 30,0	29,3 29,2 30,0 29,3	30,4 29,9 30,2 30,2	30,4 29,9 30,2 30,2
miR-93-5p	27,6 26,5 27,2 27,6	27,2 27,2 27,2 26,8	27,3 26,5 27,0 27,3	26,3 27,3 27,0 27,3	28,4 28,3 28,7 27,8	31,3 31,5 31,9 31,9	30,7 30,4 31,2 30,5	32,3 31,8 32,0 32,3	32,3 31,8 32,0 32,3
miR-674-5p	32,7 31,9 32,9 33,2	32,7 32,3 32,3 32,2	32,5 31,0 31,9 32,3	31,9 32,4 34,1 33,6	31,4 32,2 33,2 32,4	35,6 34,9 35,7 34,9	35,4 33,3 33,5 35,1	33,9 35,4 35,5 33,4	33,9 35,4 35,5 33,4
miR-674-3p	32,2 30,9 32,3 32,5	31,4 29,9 32,1 31,4	31,8 30,8 31,8 31,5	30,6 31,3 31,4 31,7	32,0 32,4 32,6 32,0	33,7 35,5 35,5 35,5	35,4 35,4 35,1 35,4	35,2 34,2 / 35,1	35,2 34,2 / 35,1
miR-23a-3p	25,3 24,7 25,3 25,2	25,0 24,9 25,4 24,5	25,3 24,4 25,0 24,5	24,3 24,7 24,4 24,9	26,4 26,1 26,3 25,3	28,4 28,9 29,2 29,2	27,3 27,4 28,0 27,9	28,8 28,0 28,9 29,4	28,8 28,0 28,9 29,4
miR-23a-5p	35,5 38,0 / /	/ 32,0 34,9 32,6	35,4 33,7 34,3 32,4	/ / 39,1 34,3	34,1 34,5 34,1 35,3	34,6 35,0 34,4 35,6	33,4 34,9 34,9 35,5	33,4 35,6 34,9 35,4	33,4 35,6 34,9 35,4
miR-499a-5p	29,0 27,7 29,4 29,3	28,8 28,3 28,1 27,9	28,6 28,0 28,3 29,3	28,0 29,6 28,4 29,4	31,3 30,7 32,7 30,9	34,2 35,6 34,3 33,3	32,9 35,4 35,6 35,2	34,7 35,5 35,0 35,2	34,7 35,5 35,0 35,2
miR-499a-3p	33,4 32,2 33,4 32,7	32,4 33,0 32,3 32,3	32,2 32,1 32,5 32,5	32,4 32,6 33,3 32,4	35,5 35,4 34,8 34,2	/ / / 35,5	35,4 35,4 / 35,7	35,2 35,4 35,0 /	35,2 35,4 35,0 /
miR-139-5p	34,9 33,7 35,5 34,5	32,8 34,4 34,4 33,8	36,8 34,9 34,9 35,2	37,2 35,5 34,3 /	35,4 / 34,5 33,9	35,3 34,6 35,1 34,7	35,4 36,2 / 35,2	36,9 / 35,5 37,2	36,9 / 35,5 37,2
miR-139-3p	33,8 35,2 35,3 34,4	35,1 33,9 33,9 31,5	34,7 33,3 34,2 35,2	35,2 35,0 35,4 35,2	33,2 33,0 34,1 32,8	35,2 33,8 34,0 34,4	34,6 34,9 34,3 35,0	35,4 33,9 35,4 35,3	35,4 33,9 35,4 35,3
let-7b-5p	23,3 22,8 24,0 23,9	23,0 23,1 24,0 22,8	23,1 22,4 22,9 22,9	23,3 23,4 23,2 24,4	25,3 24,9 26,0 24,5	27,4 28,0 27,8 27,8	26,6 26,6 27,0 26,4	29,0 28,5 28,9 28,2	29,0 28,5 28,9 28,2
let-7b-3p	29,3 28,6 29,4 29,1	29,2 28,9 29,1 28,6	29,1 28,5 28,9 28,8	28,6 28,8 28,9 29,4	30,8 30,5 31,6 29,8	32,8 32,9 32,0 33,2	31,9 32,2 33,0 32,3	32,8 33,9 33,0 34,2	32,8 33,9 33,0 34,2



miR-708-5p	30,9 30,7 32,1 32,1	30,4 30,5 30,9 30,6	30,6 30,2 30,3 30,9	30,1 30,3 30,3 30,7	32,9 31,9 33,1 32,2	34,9 35,3 34,8 35,6	35,5 35,3 35,2 35,1	34,4 34,4 35,5 34,0
miR-708-3p	35,1 34,2 36,3 35,9	35,5 33,5 35,6 35,2	34,6 36,2 35,3 35,4	35,7 35,0 34,9 32,9	36,9 35,3 35,4 38,8	/ / / /	/ / / /	/ / / /
miR-431-5p	30,0 29,0 31,1 30,1	33,1 28,8 30,7 28,2	28,4 28,1 28,4 29,2	31,4 31,2 32,4 32,9	34,3 30,6 35,5 31,9	35,2 35,5 31,4 31,8	32,6 35,3 34,5 33,3	34,4 34,5 34,0 33,5
miR-449a	33,9 32,7 32,4 /	30,9 34,1 33,1 33,1	31,2 33,7 31,9 30,9	35,6 33,2 33,0 33,0	29,4 32,1 32,2 32,0	35,0 / 34,2 35,2	32,1 35,3 33,0 32,6	34,4 / / 34,6
miR-132-3p	33,9 34,3 33,3 35,0	33,7 33,1 34,5 33,0	33,6 34,1 32,9 30,8	33,1 33,4 32,8 34,2	33,0 35,1 34,1 35,2	33,2 35,5 / 35,6	33,5 35,4 34,8 35,5	35,5 35,8 35,3 37,2
miR-132-5p	/ / / /	/ / / /	35,4 / / 35,3	34,9 / 34,6 /	35,0 34,8 / 34,0	/ / 35,5 35,6	36,2 / / /	/ / / /
miR-339-5p	28,3 27,4 28,2 28,0	27,3 27,6 27,6 27,4	28,0 27,1 27,4 27,8	26,9 27,4 27,6 27,3	28,6 28,7 29,0 28,3	30,8 31,2 32,2 31,4	30,7 30,8 31,2 30,9	32,0 31,7 32,2 32,2
miR-145-5p	32,3 31,3 32,1 32,2	31,8 32,3 32,3 31,5	31,3 31,0 31,6 30,0	31,8 32,1 32,2 32,3	32,4 31,9 32,5 32,4	33,1 32,5 33,9 33,2	32,5 32,8 32,3 32,9	34,9 32,2 35,5 33,9
miR-101a-5p	31,1 30,8 31,6 31,0	30,9 30,6 31,5 30,8	31,1 30,0 30,5 31,4	30,6 31,0 30,9 31,3	33,5 33,3 32,8 32,8	35,0 35,2 35,0 35,5	35,6 35,2 35,4 35,0	/ 34,7 / 35,1
miR-301a-5p	34,3 33,3 34,4 33,6	32,5 32,7 32,9 33,3	34,1 32,3 32,8 32,3	32,1 33,1 33,4 33,9	35,0 35,2 35,2 33,5	/ / / /	35,4 / 35,0 /	35,4 / / /
miR-488-3p	35,5 35,3 34,3 /	/ 34,2 34,6 34,7	35,5 34,9 34,8 34,8	/ / / /	35,0 / / 37,0	/ / / 35,9	/ / / /	/ 39,2 / /
miR-135a-3p	32,8 31,8 32,1 32,9	32,9 32,6 32,6 30,9	32,2 32,4 31,4 32,3	31,2 32,4 32,8 32,8	34,5 33,5 34,6 32,9	33,3 34,5 35,5 34,6	34,6 34,8 36,2 34,8	34,9 37,7 39,3 34,8
miR-1249-3p	30,4 29,2 30,8 30,3	29,9 29,5 29,9 29,3	29,8 29,3 29,3 29,5	29,2 30,2 29,8 30,4	31,2 30,7 31,8 30,7	31,5 32,4 32,4 31,9	32,2 32,4 32,5 31,7	32,1 32,0 31,6 32,3
miR-196c-5p	34,1 34,3 34,9 34,7	34,0 34,0 33,9 33,2	35,2 33,8 32,3 34,3	33,3 34,5 33,9 35,0	34,4 35,5 33,7 33,0	34,7 33,8 33,7 34,9	35,1 35,2 34,6 35,0	35,1 35,5 35,4 35,4
miR-133a-3p	34,4 35,0 34,8 35,4	34,3 34,5 32,9 32,3	35,5 34,3 35,0 35,5	34,9 35,2 34,6 35,3	34,0 35,2 35,3 35,2	35,0 33,8 34,8 32,0	35,4 34,9 34,9 35,4	35,2 34,1 35,6 35,4
miR-133a-5p	/ / / /	/ / / /	/ 35,3 / /	/ / / /	/ / / /	/ 34,9 / /	/ / / /	/ / / /
miR-300-3p	35,6 36,5 / /	37,1 37,2 / 35,0	35,2 35,5 34,9 36,8	34,4 36,6 34,8 35,5	/ 35,8 / 37,7	36,7 / 35,4 36,3	/ / / /	/ 35,2 / 38,0
miR-300-5p	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /
miR-336-5p	38,0 / 38,7 /	/ / / 35,4	38,8 / / /	/ / / /	/ / 37,8 /	39,3 / / /	/ / / 34,9	/ / / /
miR-324-5p	29,7 28,8 29,6 29,9	29,3 29,2 29,4 29,1	29,4 28,0 28,6 29,3	28,8 29,9 29,3 29,3	30,3 30,0 30,4 29,3	31,8 33,2 33,8 34,3	32,9 33,3 33,0 32,6	34,4 33,5 33,1 35,0
miR-323a-3p	/ / / /	/ 35,2 37,2 34,8	38,7 35,2 35,4 35,2	/ / / 34,9	/ / / /	/ / / 37,1	38,1 / 35,7 38,8	39,6 / / /
miR-323a-5p	37,4 38,0 / /	34,4 34,6 36,5 35,6	35,1 35,1 35,5 34,9	36,8 38,2 / /	36,3 35,5 / /	35,9 / 37,5 35,5	38,5 / 38,9 /	/ 35,9 35,6 37,0
miR-21-5p	21,2 20,7 21,4 21,4	21,1 21,3 21,9 21,0	21,3 20,2 20,9 20,9	21,8 20,3 20,4 21,4	24,9 24,2 25,4 23,5	26,6 27,7 27,8 27,6	26,7 26,8 27,3 27,0	29,3 28,8 29,3 26,7
miR-802-5p	35,2 / / /	38,9 35,7 / 34,0	34,5 35,1 35,2 39,2	36,6 32,9 35,0 35,3	/ 36,8 34,9 38,3	/ / / 35,5	/ 36,9 / 36,3	/ / 36,9 /
miR-330-3p	32,0 31,2 32,4 32,6	31,1 31,5 31,7 31,2	31,8 31,3 31,0 31,9	30,5 31,8 31,3 31,6	33,3 32,6 33,3 32,3	34,2 33,6 35,2 34,9	32,4 33,2 33,3 33,9	33,9 32,9 33,7 34,9
miR-455-5p	31,4 30,0 31,4 31,4	30,3 30,7 30,6 30,1	30,7 30,3 30,4 31,1	29,8 30,3 30,4 30,8	32,5 32,0 32,9 32,4	35,5 35,1 35,4 35,2	32,9 35,6 35,5 35,0	35,2 34,4 35,5 35,4
let-7i-5p	28,2 27,8 28,6 28,3	28,0 27,9 28,5 27,4	27,9 26,8 27,4 27,6	27,9 28,6 28,4 28,9	29,5 29,0 29,8 28,4	30,8 32,2 32,2 31,6	29,7 30,2 30,9 29,4	32,4 32,0 31,9 32,3
let-7i-3p	35,5 34,0 33,9 33,7	35,4 35,5 35,1 32,5	34,7 33,5 34,3 34,5	33,9 34,9 35,6 34,3	34,5 35,0 / 34,5	/ / / /	/ / / 38,2	/ / / /
miR-653-5p	34,6 32,7 33,6 32,7	32,5 33,1 33,0 32,1	34,0 33,3 33,2 33,9	32,4 32,3 32,2 33,0	34,7 34,1 34,9 32,4	/ / / /	35,3 / 35,5 35,0	35,5 / / /
miR-376b-3p	38,1 35,6 34,5 35,5	34,2 28,1 35,4 32,6	31,1 32,4 32,1 27,2	39,5 / 37,3 34,2	33,3 32,0 36,4 34,8	37,8 35,8 / /	34,8 34,5 / 34,6	38,0 / 35,4 39,4
miR-376b-5p	/ / / /	/ 39,0 34,8 /	/ / 36,9 39,4	/ / 38,2 /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /
miR-34c-3p	35,5 35,6 35,5 35,5	32,9 34,9 35,2 32,4	32,8 34,6 34,2 33,3	35,4 34,1 35,1 34,9	31,2 32,8 32,3 32,6	34,5 35,2 33,2 33,7	30,3 34,3 32,3 32,0	34,9 33,8 35,2 34,4
miR-488-5p	35,4 35,1 35,4 35,4	37,6 34,7 33,9 33,5	34,5 34,8 34,6 33,4	/ 35,4 35,6 34,9	/ 35,0 / /	/ 37,2 / 35,4	/ / / /	/ / / /
miR-410-3p	35,3 34,5 35,3 35,2	35,2 34,1 34,8 34,9	33,5 34,4 34,9 35,6	35,2 35,0 35,3 34,5	35,5 34,5 / 37,5	35,0 37,1 38,1 /	35,0 35,5 36,6 37,9	/ 38,7 / 36,0
mo-let-7f-1-3p	31,2 30,2 30,8 30,6	30,0 30,0 30,5 30,3	31,0 30,0 30,3 30,7	29,7 30,1 29,8 30,2	32,6 32,0 34,2 32,0	35,1 34,9 35,3 35,4	35,0 34,4 35,5 34,5	35,3 34,1 34,8 35,2
miR-340-5p	32,4 31,9 33,0 32,9	33,2 31,9 32,3 32,2	31,9 31,8 32,2 32,2	32,3 33,1 32,3 33,3	35,3 34,5 35,1 34,0	38,6 35,1 35,3 /	35,0 34,7 35,2 /	35,3 / / 39,6
miR-322-5p	29,5 29,1 29,9 29,9	29,4 29,2 29,4 28,7	29,3 28,3 29,0 28,7	29,1 29,6 29,2 29,4	31,7 30,4 31,4 29,3	34,2 / 34,9 34,3	33,8 32,7 32,8 32,9	33,3 34,7 34,2 35,0
miR-187-3p	32,5 31,4	31,8 32,1	32,3 31,5	31,5 32,5	33,0 33,3	32,8 /	34,0 34,3	33,2 35,0



miR-877-5p	34,4 35,0	33,7 35,0	33,9 34,3	33,9 33,6	35,4 32,7	33,8 35,0	32,8 34,4	34,0 34,7	35,4 34,6	35,4 35,4	35,5 33,3	34,8 33,6	34,2 35,1	33,3 33,8	34,6 34,9	33,6 /
miR-463-3p	34,6 34,8	35,0 34,7	35,5 35,6	34,3 34,8	35,0 34,6	35,0 35,5	/ 35,4	35,6 35,3	35,6 /	/	/	/	34,4 /	35,2 /	/	40,0
miR-331-3p	30,1 29,9	29,2 29,3	29,5 29,5	29,3 29,1	29,7 29,1	28,9 29,5	29,0 29,4	29,2 29,3	30,9 31,0	30,9 30,2	33,0 34,3	34,1 32,7	32,4 32,9	32,9 33,0	34,4 34,1	33,2 33,2
miR-218-2-3p	/	/	/	35,6 35,3	/	36,3 38,5	35,4 /	/	/	/	/	/	/	/	/	/
miR-673-5p	/	/	/	34,8 36,1	/	38,2 34,9	/	/	/	/	/	/	/	/	35,0	/
miR-378a-5p	29,9 29,9	28,7 29,8	30,0 29,5	29,4 28,9	30,0 28,8	28,4 29,9	28,4 28,9	29,2 29,2	30,0 30,8	30,2 29,6	31,6 32,2	31,8 32,0	31,4 32,2	31,5 31,3	32,0 32,1	31,7 32,0
miR-362-5p	34,6 35,3	33,3 35,2	34,3 34,7	33,3 34,5	34,5 34,5	33,3 33,4	33,6 35,0	33,7 34,7	35,2 33,7	34,3 35,3	35,3 37,9	35,5 35,4	35,5 /	35,3 35,3	/	35,3
miR-362-3p	33,1 32,1	32,1 32,1	32,8 32,0	31,9 31,8	31,9 31,2	31,2 32,0	32,0 32,5	33,2 32,1	35,5 33,9	34,0 31,9	/	/	34,0 35,0	33,9 35,5	35,5 /	/
miR-147b	35,5 34,2	36,0 36,5	39,3 35,0	35,1 34,5	33,9 35,1	34,0 34,5	/	/	35,6 38,7	34,4 34,5	34,6 35,0	37,7 /	35,2 35,5	33,7 34,4	35,8 33,0	36,4 33,7
let-7a-5p	23,2 23,4	22,3 23,4	22,5 23,3	22,8 22,3	22,6 22,4	21,9 22,2	22,3 22,8	22,9 23,5	24,3 25,3	24,3 23,9	28,3 29,9	29,3 29,3	28,1 28,5	28,2 27,9	30,2 30,3	29,9 29,3
miR-345-5p	29,1 29,0	28,5 28,9	29,3 29,2	29,1 28,7	29,1 28,4	28,2 29,3	28,3 29,0	38,3 28,5	29,1 30,1	29,3 29,2	31,4 32,0	31,7 31,5	31,4 32,0	31,5 31,6	32,0 31,9	31,6 31,9
miR-345-3p	32,3 32,0	31,0 31,7	32,0 31,9	30,9 31,0	32,3 31,4	31,4 31,3	31,7 31,5	32,0 31,3	31,9 32,6	32,9 33,0	34,8 35,5	35,5 36,3	35,0 /	35,5 34,7	34,7 34,8	33,9 35,4
miR-206	32,1 33,1	31,0 32,6	32,3 32,2	31,4 31,2	31,7 31,5	31,2 31,9	30,6 31,4	31,6 31,4	33,5 32,0	33,3 32,8	34,7 34,6	34,1 35,5	35,5 35,6	34,7 35,6	35,1 33,4	33,6 35,5
miR-22-3p	27,3 27,4	26,1 27,0	27,3 27,2	27,0 26,3	27,4 26,0	26,1 27,3	26,0 26,5	27,1 26,6	27,9 28,8	27,4 27,4	29,9 30,7	30,4 30,2	30,0 30,2	30,3 29,6	30,3 30,4	30,1 30,0
miR-22-5p	30,3 30,4	29,1 30,4	30,1 29,7	30,4 29,1	30,4 29,3	29,2 30,2	28,6 29,2	29,9 29,6	31,1 32,4	30,7 30,3	34,0 34,6	35,3 34,7	35,0 33,3	33,7 34,0	33,8 34,9	34,7 34,6
miR-181b-5p	29,8 30,4	29,1 30,4	29,2 29,8	29,3 29,0	29,6 28,9	28,7 29,4	28,7 29,1	29,2 29,8	30,7 31,0	30,7 30,4	32,4 32,3	32,4 32,2	31,8 31,9	31,6 31,3	31,8 32,3	31,3 32,0
miR-377-3p	37,6 /	/	/	/	/	/	/	/	35,6 /	/	/	/	/	/	/	/
miR-539-5p	/	/	35,1 34,7	37,0 36,9	34,9 /	35,6 /	/	/	/	34,4 /	/	/	/	/	/	/
miR-1-5p	34,8 /	/	/	/	39,3 /	35,6 /	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
miR-872-5p	29,1 29,4	28,4 29,4	28,0 29,1	28,6 28,1	28,8 28,2	27,9 28,6	28,2 28,5	28,4 29,0	31,9 31,7	31,9 30,1	35,4 35,6	35,5 35,3	34,5 33,7	35,1 35,0	35,4 34,7	35,6 34,6
miR-872-3p	29,6 30,0	28,6 29,8	29,0 29,4	29,2 29,0	29,1 29,1	28,8 29,4	28,4 28,7	29,3 29,2	31,0 31,1	31,4 30,5	32,9 32,9	34,1 32,9	33,9 34,0	33,0 32,6	33,8 34,5	33,3 31,9
miR-28-5p	29,1 29,4	28,3 29,4	28,8 28,9	28,6 28,5	29,0 28,2	28,1 28,9	28,3 28,8	28,9 29,3	30,7 31,0	30,7 30,2	35,2 34,6	33,9 34,0	33,7 33,7	32,7 33,0	34,4 35,0	34,5 34,9
miR-28-3p	30,3 30,4	28,9 30,6	29,1 29,8	29,2 29,2	29,7 29,4	29,0 29,6	28,5 29,4	29,3 29,5	30,6 31,1	31,0 30,5	32,3 31,8	31,9 31,4	32,4 32,3	31,4 32,0	32,3 32,7	31,9 32,3
miR-384-3p	37,3 35,6	34,7 35,5	34,9 35,6	35,6 35,0	35,3 35,4	35,2 36,2	36,0 34,8	34,9 /	/	/	/	/	/	/	/	/
miR-384-5p	35,3 33,3	34,1 34,2	33,2 33,0	33,2 31,8	33,1 32,0	32,0 32,1	35,4 34,0	32,3 33,2	34,4 34,4	34,9 34,5	35,6 /	/	36,2 38,8	37,0 /	/	/
miR-26b-5p	26,1 26,5	24,9 26,4	25,9 26,4	25,1 25,0	25,7 25,3	24,9 25,5	25,3 25,6	25,6 26,4	28,7 29,8	27,9 27,6	31,0 32,0	31,6 32,1	30,7 31,1	30,3 30,4	31,9 31,4	31,2 31,4
miR-26b-3p	32,4 33,9	32,5 34,3	33,2 33,2	32,3 32,4	33,0 32,5	32,2 33,2	32,3 32,3	32,5 32,9	34,7 35,5	33,3 34,5	34,9 34,9	35,5 35,0	35,0 35,5	35,2 34,8	34,9 34,5	35,5 35,1
miR-181a-5p	27,9 27,9	27,0 27,8	27,4 27,5	27,6 27,2	27,7 27,2	26,7 27,6	26,2 27,0	27,3 27,1	28,4 29,0	28,4 28,2	31,2 32,4	32,0 31,9	31,9 32,4	31,4 32,1	32,0 31,9	31,4 32,1
miR-181a-3p	34,5 34,5	33,0 34,3	34,0 34,6	34,0 32,8	34,3 33,1	32,9 35,4	32,9 34,3	33,4 34,0	34,7 35,4	34,6 37,4	34,8 34,8	34,0 34,4	35,2 35,3	/	34,9 33,7	35,9 /
miR-20a-3p	34,8 34,8	33,8 35,3	34,3 34,4	34,4 34,9	33,8 34,4	34,4 34,8	33,7 32,9	35,2 34,0	33,4 39,7	35,6 35,4	35,6 37,3	/	39,4 35,9	/	/	36,9 /
miR-291a-3p	33,9 30,9	32,9 31,1	30,4 33,3	28,5 31,1	31,0 28,4	29,0 30,9	34,8 34,2	34,5 31,9	28,9 32,2	26,4 32,8	33,3 26,1	29,8 26,4	31,0 32,0	32,8 32,0	32,7 32,6	34,9 32,7
miR-743a-3p	27,2 27,1	27,2 27,0	28,2 29,1	28,8 28,0	28,3 28,2	27,7 28,5	30,5 27,4	27,7 28,6	29,8 30,9	29,9 29,2	30,8 32,2	32,0 32,0	31,6 33,3	32,8 32,3	34,9 /	34,8 32,2
miR-146b-5p	31,7 31,7	31,0 31,4	31,0 31,8	31,1 30,8	31,0 30,8	30,4 29,6	30,9 31,4	31,5 31,9	32,7 32,2	32,5 32,0	34,8 33,2	35,2 34,9	34,4 35,5	35,3 33,1	/	/
miR-186-5p	30,6 31,0	29,8 31,0	30,4 31,0	29,8 29,8	30,3 29,7	29,8 30,4	29,7 30,1	30,2 30,9	32,0 33,3	31,3 31,3	34,1 34,6	34,6 34,5	33,9 35,5	34,0 34,8	34,5 34,5	33,4 35,2
miR-128-3p	31,8 31,1	30,2 31,4	31,6 30,8	30,9 30,3	30,6 30,1	30,0 31,3	30,4 31,1	31,9 31,9	33,0 34,5	32,4 32,3	35,5 33,8	35,3 34,5	34,9 34,8	35,3 33,5	/	33,0 33,5
miR-466b-5p	34,7 35,7	34,4 35,3	35,4 35,3	34,9 35,6	34,9 34,7	34,8 35,1	34,8 36,1	35,4 35,4	36,7 37,2	35,3 35,8	34,9 35,4	33,6 35,0	33,7 34,4	33,8 34,0	35,3 35,2	35,4 35,0
miR-532-3p	30,5 31,1	30,4 30,7	30,1 30,9	30,1 30,0	30,4 30,1	29,9 30,1	30,0 30,3	30,4 31,0	31,7 31,7	32,1 31,0	33,9 34,4	34,8 33,8	33,5 31,6	33,2 32,9	34,2 34,8	34,0 35,3
miR-382-5p	34,8	35,3	34,5	35,2	33,8	34,9	36,0	34,0	33,2	35,4	35,3	/	/	/	/	/

	34,8	34,9	34,5	32,5	35,1	35,5	35,5	34,5	/	35,6	/	35,2	33,9	35,2	35,1	35,1
miR-382-3p	35,5	/	36,4	35,4	35,2	33,2	36,8	/	/	36,4	37,1	/	37,8	38,2	36,2	35,5
	/	/	/	35,4	37,9	35,6	34,6	37,9	/	36,0	38,7	35,5	/	35,6	36,7	/
miR-540-3p	39,2	35,6	37,5	35,5	38,4	36,8	37,6	35,9	35,5	34,9	35,5	31,7	34,4	35,2	35,6	34,8
	38,5	/	/	37,7	36,5	36,1	/	/	34,2	35,8	35,6	35,2	35,2	34,9	34,6	35,5
miR-196a-2-3p	36,9	35,5	/	35,6	34,7	37,7	/	/	/	34,6	/	/	/	/	/	/
	/	/	/	32,5	35,4	36,9	35,2	35,5	/	/	35,6	35,8	/	/	/	/
miR-202-5p	/	37,3	37,5	/	/	/	/	35,4	/	/	35,4	/	/	/	/	35,4
	/	/	/	/	/	35,8	37,2	35,2	/	/	/	/	/	/	/	/
miR-124-3p	34,8	33,9	35,5	31,4	33,3	32,9	34,9	37,0	33,0	31,6	35,5	34,7	33,5	33,9	35,7	35,6
	33,9	35,0	35,4	29,1	33,7	31,8	39,1	35,1	34,8	32,0	34,9	33,0	35,5	34,3	34,8	35,6
miR-124-5p	/	/	/	/	/	35,5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	39,2	/	/	/	/
let-7e-5p	27,0	26,0	26,7	26,4	26,8	26,2	26,0	26,9	29,3	28,8	30,9	31,8	29,7	30,1	32,2	31,9
	27,5	27,3	27,0	26,1	26,3	27,0	26,4	27,1	29,2	28,2	31,8	31,1	30,7	30,1	31,4	31,7
let-7e-3p	32,5	31,4	32,0	31,7	32,4	31,5	31,2	32,6	32,4	34,2	33,0	33,0	39,3	33,0	35,6	35,2
	32,7	32,7	32,2	32,0	32,3	32,5	32,3	32,3	34,5	32,5	35,2	34,5	35,1	34,4	35,3	33,9
miR-875-5p	36,7	/	/	/	/	36,1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	37,3	/	/	/	/	/
miR-34b-5p	35,1	32,8	32,0	34,4	31,6	32,7	34,5	32,9	29,5	31,1	34,4	35,2	32,4	33,7	36,7	35,0
	33,1	34,8	32,3	33,0	31,9	32,0	32,1	34,5	31,6	31,5	35,3	38,6	34,6	33,0	35,0	35,2
miR-34b-3p	33,1	33,5	30,1	33,3	30,4	32,1	34,7	32,0	28,2	31,0	34,4	35,4	28,4	31,9	34,8	34,3
	31,8	33,7	32,8	33,0	32,0	30,6	32,8	32,7	29,2	30,1	33,0	35,4	30,4	29,4	34,8	31,9
miR-425-5p	28,9	27,8	28,4	28,3	28,2	27,5	28,2	28,7	29,0	29,2	31,4	31,8	30,2	31,3	32,0	32,0
	29,0	28,9	28,7	27,9	27,9	28,4	28,3	28,8	29,5	29,0	31,8	32,0	31,6	30,4	32,0	31,5
miR-350	32,3	31,8	31,6	31,9	32,5	31,3	31,7	32,1	34,2	34,5	34,0	/	35,5	33,8	35,0	36,2
	32,4	32,3	32,1	31,5	32,2	32,1	31,7	32,0	35,1	33,9	33,7	36,6	34,4	35,1	35,7	33,9
miR-761	35,0	34,9	36,5	34,2	35,1	33,8	/	/	35,9	33,5	36,8	35,0	34,8	35,5	35,7	35,4
	/	34,6	34,0	28,1	35,5	33,3	/	35,8	34,9	31,5	35,5	34,8	35,5	35,2	35,6	36,2
miR-329-3p	/	/	/	38,9	/	34,6	/	/	/	/	/	/	/	/	37,2	/
	34,2	/	/	/	/	/	34,0	34,1	/	/	/	/	/	/	/	/
miR-298-5p	35,0	37,0	34,3	35,2	34,4	35,3	38,3	/	35,3	37,4	/	35,5	35,7	/	36,0	/
	34,8	35,0	/	34,0	34,9	34,7	/	37,6	/	35,7	34,9	36,8	38,1	/	/	35,5
miR-290	32,6	33,3	34,0	33,2	33,7	32,9	34,0	33,0	33,7	/	/	/	/	/	/	/
	33,6	33,1	34,0	32,1	33,3	33,9	33,2	35,5	/	38,7	/	/	35,5	/	/	/
miR-130b-5p	/	37,6	34,3	34,7	34,6	34,8	/	34,4	/	38,9	35,0	36,4	35,4	36,3	35,0	37,0
	/	/	/	36,7	36,9	34,6	/	34,8	34,4	35,5	/	/	37,1	35,6	35,3	37,7
miR-191-3p	31,7	32,3	32,5	32,2	32,8	32,4	32,4	34,5	34,0	34,1	35,0	35,4	33,6	34,9	36,5	35,5
	31,8	33,1	32,3	32,3	32,5	32,4	32,6	32,7	35,2	33,9	35,6	35,2	35,3	33,9	33,7	35,0
miR-500-3p	34,7	33,2	34,4	34,4	34,3	33,0	34,1	33,9	33,7	32,6	/	35,5	34,8	34,8	35,0	/
	34,4	34,5	34,5	33,1	32,4	33,2	34,7	34,2	34,4	33,2	37,1	34,4	/	34,9	37,8	35,5
miR-668-3p	/	/	/	/	/	37,2	/	/	/	/	/	/	/	/	35,2	/
	/	/	/	37,0	/	36,3	/	/	/	/	/	35,4	/	36,6	35,5	35,6
miR-153-3p	38,1	/	/	35,0	34,0	33,9	34,0	/	37,1	33,8	/	/	/	39,2	/	/
	/	/	34,3	35,5	/	38,7	34,0	/	/	/	/	35,8	/	/	/	/
miR-96-5p	28,3	27,3	27,9	27,8	27,9	26,6	27,2	27,8	30,0	29,6	31,9	32,8	33,1	32,3	35,5	35,5
	28,3	28,0	28,4	27,1	27,2	27,8	27,3	27,4	31,8	29,3	34,3	34,1	34,0	32,9	35,2	33,7
miR-216b-5p	35,7	36,2	35,4	34,9	35,3	35,0	/	37,0	35,2	35,4	36,9	35,6	33,7	38,3	35,5	/
	39,8	36,4	37,9	32,9	34,9	35,5	35,4	/	36,4	/	36,9	35,4	35,4	35,6	35,6	35,4
miR-369-3p	34,7	38,0	35,3	34,9	/	34,9	35,9	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	36,4	33,5	/	/	36,5	34,9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
miR-369-5p	/	35,5	35,6	38,2	32,8	34,9	35,4	33,7	/	/	35,4	35,4	35,6	/	/	/
	33,3	35,3	35,0	33,4	32,9	34,3	36,3	/	35,6	35,5	35,3	35,6	35,4	34,9	/	35,5
mmu-let-7f-2-3p	33,6	32,5	33,3	32,5	32,9	32,2	33,3	33,4	35,5	35,0	/	/	35,0	34,7	/	35,6
	34,6	34,3	33,6	32,9	32,1	33,3	33,5	33,9	35,6	35,1	/	35,3	35,6	37,0	35,5	/
miR-144-3p	34,9	/	35,3	32,4	35,0	38,5	27,4	35,4	/	32,3	35,0	35,5	35,3	/	/	/
	34,0	34,7	35,4	35,4	34,8	35,5	/	35,5	/	35,5	/	/	/	35,3	/	/
miR-99a-3p	35,3	34,5	34,2	35,1	35,2	33,2	34,4	34,3	35,3	34,3	35,5	/	35,4	/	/	/
	34,2	34,0	35,0	34,6	33,0	34,0	35,2	34,9	/	32,7	37,1	/	/	/	/	/
miR-103a-3p	26,3	25,0	25,4	25,1	25,8	24,6	24,7	25,6	26,2	26,4	29,6	30,1	29,3	29,4	30,4	30,0
	26,0	26,0	25,5	25,3	24,6	25,7	25,5	25,4	26,8	25,9	30,4	30,4	29,9	29,2	30,0	30,4
miR-30a-5p	25,4	24,0	25,1	25,0	25,1	24,6	24,4	24,8	27,4	26,8	28,4	28,8	27,6	28,1	28,5	28,2
	26,1	26,0	25,8	24,8	25,2	25,5	24,9	25,3	27,1	26,6	28,5	28,6	28,1	28,2	28,2	28,8
miR-30a-3p	27,2	26,2	27,0	27,3	27,4	26,6	26,4	27,0	28,8	28,4	31,8	32,1	31,2	31,0	32,2	31,8
	27,8	27,7	27,2	26,8	27,1	27,0	26,8	27,3	29,0	27,9	31,9	32,1	32,0	31,5	32,2	32,1
miR-883b-3p	30,3	29,7	31,0	32,0	31,4	30,5	32,6	30,5	34,0	32,9	35,3	35,4	37,0	35,4	/	35,2
	30,1	29,8	32,4	31,3	30,9	31,4	30,6	31,6	35,1	32,9	35,1	35,1	34,9	35,5	/	35,0
miR-136-3p	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/	/	/	34,3	/	/	/	/	/	/	/	/
miR-191-5p	27,3	26,2	26,5	26,4	26,4	25,7	26,0	26,3	27,6	27,7	28,4	28,4	27,7	27,4	28,7	28,2
	27,4	27,4	27,0	26,1	26,3	26,3	26,6	26,9	28,2	27,3	29,0	29,0	28,4	27,9	28,8	28,8
let-7c-5p	23,1	22,9	22,9	23,0	22,9	22,0	23,5	23,2	24,6	24,3	26,3	27,2	25,9	25,8	28,2	28,0
	23,8	23,4	24,1	22,3	22,9	22,8	23,4	24,5	25,3	24,0	27,3	27,0	26,4	25,3	28,3	27,1
let-7c-3p	35,2	34,0	/	/	34,9	/	35,0	35,4	/	/	36,8	/	/	/	/	/
	33,1	/	34,3	35,6	35,0	34,6	34,9	35,5	/	35,0	/	/	/	/	/	/

miR-219a-5p	30,1 30,0	28,9 30,1	29,8 29,7	29,2 28,9	29,4 28,8	28,6 29,5	29,2 29,9	29,6 30,4	31,9 33,0	30,9 30,1	35,6 35,6	35,3 33,6	32,6 34,2	32,2 34,4	34,6 35,4	34,6 33,3
miR-221-3p	28,8 28,1	28,0 27,9	28,2 28,6	28,2 27,5	28,3 27,7	27,2 27,7	28,7 28,1	28,2 29,1	28,9 29,6	29,3 28,3	31,3 32,1	32,0 32,0	31,0 31,8	31,1 30,4	31,5 33,4	32,3 32,0
miR-672-5p	31,1 31,1	31,1 31,9	30,2 31,5	31,0 31,0	30,8 30,6	30,3 30,4	31,4 31,0	31,3 30,6	31,1 31,1	31,6 30,8	34,6 34,0	35,1 34,1	32,4 32,3	33,1 32,6	35,5 35,6	35,3 34,1
miR-130b-3p	34,9 35,3	33,4 35,2	35,5 35,3	34,3 33,1	35,2 34,1	35,5 35,5	34,8 35,2	34,7 34,9	36,8 35,0	34,3 34,2	35,3 35,6	35,2 35,5	33,7 34,9	34,7 34,4	35,9 34,7	35,5 35,0
miR-342-3p	29,8 30,4	28,6 30,1	28,7 29,1	28,8 28,3	29,3 28,4	28,3 28,7	29,5 29,9	30,0 30,4	30,7 30,3	30,4 29,7	32,3 32,3	31,5 32,3	31,1 31,1	30,6 31,3	32,6 32,5	32,7 32,5
miR-219a-1-3p	35,3 34,9	35,3 35,1	34,7 34,9	32,8 27,8	35,3 34,1	32,7 35,4	35,2 35,1	35,0 /	34,1 35,3	31,2 32,9	34,9 34,2	34,7 35,1	32,9 34,6	35,4 35,5	34,8 35,5	35,0 35,5
miR-99b-5p	26,9 26,9	25,8 27,0	26,2 26,3	26,3 26,0	26,3 26,1	25,8 26,4	25,4 26,3	26,4 26,4	27,7 27,8	28,0 27,3	29,3 30,1	29,4 30,0	29,1 29,5	28,9 29,2	29,3 29,6	29,1 30,2
miR-99b-3p	31,8 32,4	31,5 32,4	31,8 31,9	32,0 31,4	31,9 31,7	31,3 31,8	31,4 32,5	32,1 32,0	32,9 33,0	31,2 32,4	34,9 35,5	35,6 34,2	34,1 35,1	33,8 35,3	35,5 34,6	35,1 34,8
miR-742-5p	30,6 30,4	30,1 30,4	31,4 32,7	31,5 31,0	31,3 31,3	31,1 31,3	32,8 30,4	30,8 32,2	34,4 35,4	35,3 33,4	35,2 35,0	34,8 34,5	34,5 35,2	34,9 33,3	/	/
miR-190a-5p	32,3 31,8	32,2 32,7	32,3 32,1	32,4 31,5	32,3 32,2	31,9 32,5	32,2 32,0	32,6 32,7	35,4 35,4	34,5 33,8	34,9 /	35,2 /	35,1 35,4	35,6 35,4	35,2 /	35,4
miR-17-1-3p	30,3 30,4	29,5 30,4	29,9 30,2	30,2 29,6	30,2 29,8	29,4 30,3	29,3 30,0	30,3 30,3	32,0 33,0	32,0 30,9	35,5 35,6	/	35,2 34,4	35,6 35,4	/	35,5 34,8
miR-376a-5p	/	/	/	/	35,4	36,9	36,5	/	/	36,8	/	/	/	/	/	/
miR-352	29,3 30,2	27,9 29,9	29,4 29,9	29,0 28,4	29,1 28,2	28,2 29,1	29,0 29,2	29,1 30,3	31,0 31,9	30,3 30,3	32,3 32,8	31,9 32,4	31,3 32,3	31,7 31,3	32,6 32,2	32,3 32,8
miR-182-5p	27,8 28,1	27,0 27,5	27,4 28,0	27,4 27,3	27,5 27,1	26,9 27,5	26,1 26,3	26,8 27,0	29,2 30,4	29,3 29,3	31,5 31,9	31,3 31,9	31,9 31,9	31,3 31,8	32,0 31,6	31,0 31,4
miR-15b-5p	28,3 29,6	27,4 29,1	28,7 29,6	28,1 27,7	28,0 27,9	27,3 27,6	28,6 29,1	28,2 30,2	31,0 32,1	29,4 30,2	32,2 32,4	33,0 32,2	30,3 31,8	31,3 30,9	33,3 32,4	33,3 32,6
miR-15b-3p	31,9 31,9	31,3 32,0	31,7 32,2	31,1 31,1	31,4 31,4	31,3 31,4	30,8 31,6	31,7 31,9	33,3 32,9	32,5 32,7	35,4 35,7	35,3 34,3	34,8 33,8	35,3 35,6	36,1 34,9	35,6 34,9
miR-30c-2-3p	32,3 32,4	31,4 32,2	32,2 32,3	31,7 31,4	33,1 31,4	31,5 32,1	31,3 32,0	32,0 32,4	32,3 32,8	32,0 31,4	35,1 34,8	35,3 35,1	33,4 35,4	34,1 35,1	34,0 35,0	34,4 35,5
miR-27a-3p	27,4 27,9	26,3 27,8	27,5 28,0	27,3 26,9	27,4 27,3	26,8 26,9	26,7 26,9	26,7 27,4	30,8 30,2	29,1 28,8	31,4 31,4	32,4 31,6	30,6 30,8	30,7 31,0	31,4 31,6	31,3 31,8
miR-27a-5p	33,4 33,7	33,8 35,5	34,6 34,8	34,9 34,1	34,9 34,1	32,4 32,8	33,8 34,0	34,0 35,2	34,3 33,4	33,1 33,6	35,1 35,0	35,9 34,6	34,7 35,4	35,4 34,8	35,6 34,9	35,5 35,6
miR-196a-5p	31,5 32,0	30,4 32,4	31,7 32,4	31,3 31,1	31,0 31,0	30,7 31,7	30,7 31,2	30,9 32,1	32,2 33,1	32,2 31,7	35,1 35,6	34,8 35,2	33,2 35,5	34,9 34,3	34,5 34,2	34,5 35,1
miR-543-3p	37,1 37,2	33,3 36,8	35,4 34,4	34,0 34,9	33,6 35,4	35,0 35,4	/	/	35,5	34,7	36,2	/	35,0	35,6	/	39,2
miR-376c-3p	35,0 35,0	36,4 34,1	35,5 34,8	34,9 35,5	33,8 33,4	35,5 34,9	34,5 35,5	32,8 36,8	35,7 35,3	38,0 34,0	35,5 /	/	/	/	/	36,9
miR-504	31,0 31,5	30,8 31,3	31,2 31,5	30,4 30,5	30,4 29,9	29,8 30,0	31,4 31,2	30,9 31,3	31,7 32,1	30,5 31,3	34,2 33,5	34,8 32,5	32,6 33,6	34,6 31,8	34,9 35,0	34,4 33,9
miR-327	34,8 35,5	35,4 36,5	/	35,3 31,3	34,9 35,0	34,2 35,0	37,6 /	34,8 37,3	/	35,6 35,2	/	/	37,8	37,6	/	/
miR-676-3p	35,5 /	34,6 34,9	34,7 34,9	33,3 35,4	35,4 33,4	35,1 34,2	33,4 34,3	35,0 35,5	35,0 35,2	35,1 35,0	38,3 35,5	/	35,6 38,4	/	37,0 38,7	39,1 36,5
miR-122-5p	/	36,0	/	35,3	34,5	35,5	34,7	/	34,5	33,2	35,5	/	32,6	34,1	35,5	/
miR-291a-5p	33,2 35,3	34,8 34,2	35,4 35,3	34,5 32,4	35,1 34,2	34,6 34,5	34,9 35,6	35,3 35,8	32,8 35,0	33,0 32,3	34,8 34,5	34,2 34,4	32,7 33,7	34,6 33,4	35,4 34,3	35,4 32,9
miR-98-5p	30,4 30,8	29,2 30,8	30,2 30,4	30,0 29,1	29,7 29,4	29,2 29,8	29,9 29,8	30,3 31,2	32,3 32,6	31,4 31,4	33,4 34,7	33,6 34,1	32,0 33,3	32,8 32,8	35,2 35,5	35,3 33,8
miR-449c-5p	/	/	/	35,4	35,3	35,6	/	/	/	36,9	/	/	37,7	38,1	/	/
miR-23b-3p	24,4 24,2	23,7 24,1	24,4 24,8	24,3 23,7	24,4 24,4	23,9 24,4	23,0 23,3	23,4 23,4	26,0 26,4	25,9 25,3	27,6 28,3	28,0 28,3	27,4 28,3	27,2 27,9	27,4 27,8	26,8 27,8
miR-489-3p	32,6 32,9	31,2 32,8	32,0 32,0	31,2 31,2	32,2 31,3	31,3 31,4	30,7 30,9	31,1 31,4	33,1 32,6	32,1 31,4	33,1 35,1	35,2	34,0 35,2	35,6 35,1	34,9 /	33,9 35,6
miR-142-5p	35,0 /	/	35,7 33,4	36,4 36,2	34,5 34,5	35,4 31,1	33,1 35,6	35,6 36,4	34,5 35,2	35,2 35,2	34,6 35,5	35,1 34,8	35,1 31,9	35,6 35,2	/	35,2 36,0
miR-142-3p	28,6 31,9	31,1 34,8	32,5 31,1	31,1 32,2	32,3 29,2	30,6 24,3	26,4 32,8	34,3 35,0	34,2 32,7	31,5 33,2	33,7 35,4	35,5 35,6	34,1 33,3	35,4 32,8	34,9 35,4	34,0 /
miR-361-5p	28,1 28,4	27,1 28,4	27,4 28,0	27,5 27,4	27,7 27,3	27,2 27,4	27,0 27,1	27,4 28,0	29,3 29,7	29,2 29,0	31,3 32,1	31,4 32,2	31,0 31,5	31,2 31,6	31,9 31,9	31,0 32,3
miR-208a-3p	35,8 /	34,7 /	36,0 37,6	34,6 34,4	35,4 35,3	35,0 35,3	38,8 /	35,1 35,5	34,7 36,2	35,6 35,2	35,2 35,0	34,0 35,1	35,2 35,0	34,0 35,0	35,2 34,5	35,1 35,0
miR-219a-2-3p	35,2 34,3	32,8 35,2	33,1 33,3	32,8 32,3	33,3 32,0	32,1 32,2	33,0 33,8	33,6 34,4	35,0 34,7	34,3 34,0	34,4 34,5	34,0 35,6	34,3 35,2	34,4 34,4	35,3 34,6	35,6 35,5
miR-343	35,0 /	37,5 /	38,5 38,9	34,2 30,1	35,5 35,2	34,7 35,2	/	/	37,5	/	35,5 35,8	35,6 35,4	35,6 35,5	/	38,5 39,4	36,3 39,5
miR-30e-5p	24,5	23,2	24,2	24,0	24,3	23,4	23,5	24,0	26,8	26,2	30,3	30,4	29,3	29,9	30,1	29,9



miR-344a-3p	34,3 /	35,3 39,4	34,5 35,2	34,9 32,6	35,2 34,9	34,7 35,4	35,1 38,6	36,6 /	/	35,5 34,5	35,4 36,5	36,4 35,4	37,1 39,6	33,9 37,2	35,5 35,2	/	38,2
miR-344a-5p	/	/	/	34,0 37,0	37,8 33,7	34,8 35,6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
miR-568	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
miR-125b-5p	26,9 27,0	26,4 27,1	26,3 27,0	26,3 25,9	26,3 26,3	25,6 26,3	26,4 26,4	26,8 27,2	26,8 26,7	26,9 26,1	29,2 29,7	29,6 29,7	27,5 28,3	27,5 27,8	29,8 30,2	29,3 30,0	
miR-125b-1-3p	37,0 /	/	/	34,8 31,1	35,3 35,3	32,9 34,4	/	/	/	35,0 33,9	35,9 35,0	37,3 35,0	35,4 35,5	35,4 34,9	38,3 35,6	37,0 35,4	
miR-203a-3p	26,2 26,5	25,1 26,4	25,8 26,1	25,9 25,5	26,1 25,6	25,4 23,1	24,6 25,0	25,2 25,7	27,6 27,0	27,3 27,0	29,7 30,8	30,0 30,6	29,6 30,2	29,2 30,2	30,2 30,2	29,3 30,6	
miR-409a-3p	36,4 33,8	35,5 37,1	34,8 36,9	33,1 29,2	35,2 34,4	34,1 33,6	35,2 35,5	34,8 35,5	35,4 34,9	31,8 32,2	34,9 34,8	35,0 35,0	34,8 35,8	35,5 33,9	35,6 34,9	35,3 35,4	
miR-320a	27,0 27,2	25,8 27,5	26,7 27,1	26,5 26,2	26,5 26,0	26,1 26,8	26,0 26,4	26,9 27,3	27,4 27,9	27,2 27,1	29,1 29,1	29,3 29,2	28,9 29,6	28,7 29,3	29,7 29,6	29,3 29,9	
miR-193a-5p	32,0 32,8	31,4 32,7	31,4 32,2	31,9 30,9	31,8 31,2	31,4 32,0	31,0 31,6	31,5 32,2	33,0 33,9	32,4 32,1	35,0 35,3	34,8 34,0	34,9 35,5	34,5 34,4	34,9 34,2	34,5 34,2	
miR-141-3p	23,1 23,4	23,1 23,1	22,7 24,2	23,3 22,5	23,1 23,0	22,4 22,7	25,0 23,2	22,9 24,2	26,9 28,4	26,3 25,2	29,3 30,2	30,4 29,6	29,3 30,3	29,3 29,3	32,7 32,7	32,3 29,7	
miR-126-5p	35,3 34,8	34,3 34,7	35,3 35,5	35,5 34,9	34,9 35,3	34,8 33,9	34,7 34,9	35,3 35,3	34,9 35,0	35,6 35,2	/	35,4 36,6	35,2 /	37,4 35,4	/	35,9	
miR-126-3p	31,2 32,3	31,0 32,1	31,1 31,8	31,3 30,8	31,5 31,0	31,1 31,5	32,9 32,7	32,6 34,2	33,1 34,5	33,0 32,0	35,2 34,5	35,4 35,5	34,4 34,8	34,5 35,3	34,2 34,2	34,5 35,3	
miR-379-3p	38,9 35,2	/	35,8 35,5	38,7 34,4	34,0 35,1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
miR-183-5p	28,0 28,5	26,4 28,3	27,8 28,3	27,8 27,4	27,9 27,4	27,2 27,7	26,6 26,9	27,1 27,3	30,3 30,9	29,7 29,0	32,1 32,8	32,4 33,4	32,3 33,3	32,2 33,1	33,0 33,1	32,3 32,4	
miR-155-5p	32,9 34,5	35,3 35,4	35,3 34,5	35,1 34,7	35,0 33,7	32,4 34,9	35,4 35,5	35,6 35,0	34,1 34,5	33,7 33,2	35,0 /	/	35,4 35,6	33,9 34,4	35,5 35,4	35,5 35,5	
miR-135a-5p	27,1 27,2	25,6 27,3	26,9 26,9	26,6 26,1	27,2 26,5	26,1 27,1	25,2 26,1	26,0 26,2	30,8 31,0	29,4 29,2	34,4 34,7	34,4 35,6	34,2 34,2	33,8 34,7	35,0 34,4	34,2 34,0	
miR-326-3p	34,9 34,5	33,0 34,3	34,6 34,0	33,3 32,7	34,5 33,4	32,7 33,3	33,9 35,3	35,3 33,9	32,1 33,0	32,1 31,8	34,2 34,1	34,1 34,6	34,5 34,2	34,4 35,2	34,3 34,7	34,9 35,6	
miR-101-3p	25,3 25,6	24,1 25,4	25,0 25,1	24,9 24,4	25,2 24,7	24,3 25,0	24,3 24,8	24,7 25,2	29,5 30,0	28,3 27,8	31,4 32,5	32,2 32,3	31,1 32,0	31,0 31,0	32,2 32,2	31,9 31,6	
miR-490-3p	/	/	/	/	/	35,8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
miR-490-5p	/	/	/	35,5 34,9	/	/	/	38,1 36,9	/	/	/	/	/	/	/	37,8	
miR-383-5p	34,7 38,1	/	/	38,9 35,0	/	35,5 34,9	35,2 37,8	/	/	/	38,0 /	/	33,8 /	/	/	/	
miR-125b-2-3p	34,1 35,1	33,5 34,6	32,1 34,5	34,1 31,5	31,8 32,6	32,7 34,5	33,8 34,2	34,3 33,8	34,2 34,1	34,1 32,3	35,3 35,3	34,2 35,4	33,7 33,8	35,3 33,3	35,6 34,4	34,2 35,3	
miR-215	34,6 34,0	32,0 33,9	32,4 32,8	33,1 31,4	32,9 32,6	32,6 33,2	33,2 32,9	33,0 34,2	35,6 32,3	32,5 29,1	34,9 34,6	34,5 35,4	35,2 34,8	33,9 34,5	35,6 35,2	33,2 34,9	
miR-150-5p	31,6 32,4	32,0 33,0	32,3 32,7	32,0 31,6	32,3 31,3	31,7 31,7	30,4 33,2	32,6 32,7	32,8 31,4	32,9 32,1	32,1 33,2	33,4 34,4	32,9 31,3	32,6 32,6	33,3 35,3	35,0 34,6	
miR-204-3p	32,2 32,7	31,0 32,4	31,9 31,6	31,5 31,9	32,2 31,1	31,4 32,2	31,2 32,4	32,4 32,3	33,0 32,0	33,4 33,7	33,9 35,3	34,1 35,5	34,8 35,5	34,4 34,9	34,9 34,8	35,6 33,0	
miR-671-3p	34,8 34,1	32,2 33,3	33,1 34,2	34,1 33,3	34,7 33,9	33,9 33,3	33,0 34,4	33,3 33,9	35,3 33,8	34,9 34,7	35,5 35,6	35,0 33,7	37,4 34,2	36,6 35,4	35,0 37,6	35,5 35,3	
miR-200b-3p	23,4 23,5	23,2 23,3	23,1 24,4	23,4 22,7	23,3 23,3	22,3 22,9	24,4 23,3	23,2 24,4	25,3 26,4	25,1 24,5	27,8 28,0	28,8 27,7	27,9 28,8	27,3 27,5	30,5 31,0	30,2 28,3	
miR-301a-3p	28,9 29,0	27,7 29,2	28,3 28,0	28,2 28,0	28,4 28,0	27,8 28,4	27,4 28,3	28,3 28,5	32,0 31,8	30,6 29,8	35,5 34,2	34,6 33,5	33,9 34,6	33,6 33,7	34,8 34,5	35,4 34,7	
miR-532-5p	31,4 31,4	30,9 31,4	30,9 31,4	30,9 30,6	31,1 30,3	29,9 30,7	30,9 31,3	31,0 30,7	32,0 32,3	31,3 31,0	34,9 34,2	34,9 35,6	32,9 35,3	32,8 34,9	/	34,8	
miR-92b-3p	35,5 39,2	35,2 33,3	33,8 33,4	35,0 35,2	35,6 35,2	34,3 34,9	35,4 34,8	35,5 34,0	34,5 34,8	34,4 35,6	35,0 35,5	34,5 34,7	34,3 33,2	35,6 35,1	/	34,9	
miR-503-5p	34,7 34,1	32,7 32,7	34,6 33,5	34,2 32,1	33,4 33,0	32,5 32,2	32,4 33,8	33,3 33,0	33,7 33,3	32,4 32,7	38,7 /	/	33,3 35,6	34,9 34,8	34,9 34,9	35,4 34,9	
miR-342-5p	35,2 /	34,6 /	34,6 34,3	34,3 34,8	34,0 33,5	34,1 34,6	33,2 35,5	34,4 34,3	35,3 34,0	34,9 35,4	35,5 /	34,8 /	35,3 35,4	35,5 35,4	/	/	
miR-19b-3p	25,8 25,9	25,0 25,6	24,9 25,6	25,1 24,9	25,3 24,8	24,3 24,6	24,9 25,4	25,1 25,5	27,6 28,1	27,3 26,4	31,0 31,6	31,2 31,3	28,7 29,7	29,9 29,1	31,4 31,9	31,3 30,8	
miR-7a-1-3p	31,1 31,0	29,8 30,9	30,0 30,8	29,9 29,8	30,8 29,9	29,5 30,1	30,4 30,6	30,3 30,9	32,2 32,2	32,1 31,4	33,0 34,0	33,9 35,0	34,9 35,5	35,4 34,6	34,4 35,3	34,5 35,5	
miR-29a-3p	26,3 26,4	25,2 25,9	25,8 26,0	25,4 25,1	25,6 25,0	24,4 25,6	25,4 25,4	25,9 26,1	27,3 28,3	26,4 26,3	29,9 31,1	31,1 30,6	29,5 30,4	29,8 29,1	31,4 31,3	30,3 30,4	
miR-29a-5p	28,3 28,3	27,4 28,4	27,8 28,4	27,9 27,6	28,1 27,5	27,3 28,0	27,4 27,6	27,8 28,3	31,2 31,8	30,7 29,9	34,2 33,0	34,0 35,2	35,1 35,1	33,3 34,2	33,8 34,4	33,1 34,0	
miR-542-3p	32,3 35,1	32,3 34,4	34,6 33,7	32,3 32,0	32,7 32,0	32,2 32,4	33,3 33,0	33,2 34,3	33,6 34,5	34,2 35,2	35,4 35,9	/	35,4 35,1	35,3 34,8	36,7 35,2	35,3 36,7	

miR-375	26,4 26,0 26,4 26,1	25,3 25,9 26,7 25,2	25,8 25,0 25,8 25,3	26,3 26,2 26,1 27,0	27,0 27,7 28,3 26,9	28,8 29,1 29,2 29,0	28,1 28,3 29,0 28,3	30,3 29,7 30,6 29,4
miR-339-3p	30,8 30,1 30,8 31,0	30,3 30,0 30,3 30,0	30,1 29,9 29,9 30,4	29,9 30,4 30,3 30,7	32,2 32,1 32,7 31,6	35,0 34,2 35,1 34,0	33,7 33,6 34,6 34,1	34,5 33,8 33,8 35,5
miR-138-1-3p	32,5 32,3 34,4 33,3	32,7 33,2 33,5 33,0	34,3 33,8 32,9 34,8	31,5 32,4 31,7 32,3	35,3 33,9 35,4 34,1	35,0 33,4 34,9 34,6	34,7 / / /	33,0 34,2 35,0 /
miR-34a-5p	30,7 29,4 30,4 29,3	30,2 29,7 29,8 29,5	30,0 28,4 28,7 29,8	32,0 31,4 32,2 31,6	29,7 29,3 30,1 29,1	33,4 32,5 34,6 32,6	32,3 32,9 32,6 31,9	34,5 33,9 33,9 35,4
miR-542-5p	34,9 31,9 32,7 32,9	32,6 33,8 33,3 33,0	34,3 32,8 32,6 34,5	32,5 32,9 33,0 33,0	34,4 32,7 33,1 31,9	34,5 / 35,0 35,0	35,1 35,6 35,0 35,4	34,7 35,4 34,9 38,4
miR-214-3p	30,3 30,3 30,9 31,0	30,3 27,9 31,4 28,3	30,5 29,3 31,2 29,3	32,2 30,4 32,7 31,4	33,6 30,0 34,4 32,3	34,8 35,5 33,6 35,4	32,9 34,6 35,3 33,2	35,6 34,7 34,9 35,3
miR-205-5p	28,2 27,9 28,4 28,3	27,8 28,0 28,4 27,4	28,0 27,4 27,8 25,3	27,8 29,1 28,6 29,3	28,5 28,6 27,3 27,7	31,0 31,2 31,9 31,1	30,0 30,3 30,0 30,2	32,0 32,0 31,2 32,2
miR-188-5p	32,7 32,6 35,5 33,9	34,0 27,1 31,6 27,1	32,4 30,9 30,9 28,9	33,9 34,2 35,5 34,0	34,5 32,3 35,2 32,2	36,0 35,5 35,9 35,6	35,5 35,5 33,8 35,5	/ / 35,4 35,4
miR-92a-3p	26,8 25,9 27,1 27,0	26,3 26,2 26,7 25,9	26,4 25,6 26,0 26,0	25,2 26,1 26,3 26,8	27,9 28,2 28,1 27,5	29,1 29,2 29,9 30,1	28,5 28,6 28,7 28,3	29,2 28,7 29,4 29,3
miR-196b-5p	26,9 26,6 27,3 27,1	26,5 26,9 27,2 26,2	26,7 26,1 26,6 26,6	26,3 26,5 26,2 27,0	29,0 28,8 29,3 28,0	32,4 32,8 32,6 33,1	31,9 32,1 31,9 31,8	32,7 32,8 31,9 33,3
miR-328-3p	27,1 26,4 27,3 27,3	26,8 26,8 27,1 26,5	27,1 26,1 26,6 27,4	26,0 26,8 26,3 26,8	27,5 28,2 27,9 27,4	29,1 29,1 30,0 30,0	29,2 28,8 29,2 29,4	29,1 29,3 29,6 30,0
miR-493-5p	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /
miR-27b-3p	25,2 24,3 25,2 25,1	25,0 24,9 25,4 24,4	25,3 24,1 24,9 24,9	23,8 24,2 24,2 24,1	28,3 27,2 28,2 26,2	30,9 31,4 31,1 30,8	30,1 30,1 30,3 30,3	30,7 30,3 31,0 31,0
miR-200a-3p	22,8 22,2 22,8 22,5	22,4 22,7 23,3 22,2	22,8 21,8 22,1 22,4	23,6 22,4 22,3 23,3	25,3 24,9 26,4 24,2	28,4 29,9 29,2 28,8	28,7 28,5 29,4 28,4	31,6 31,1 31,6 29,0
miR-17-5p	28,1 26,9 28,3 28,2	27,5 27,3 27,9 27,0	27,8 26,6 27,2 27,2	27,2 27,4 27,8 28,1	29,3 28,7 29,5 28,1	31,6 31,5 32,2 32,1	30,9 30,6 31,2 30,4	32,3 31,5 32,3 32,3
miR-185-3p	/ 35,6 / 36,8	37,3 34,9 / 35,5	/ 34,4 34,5 33,8	/ 35,5 / /	35,0 34,6 35,4 35,3	34,7 34,6 34,6 34,0	35,5 34,7 35,1 35,5	34,6 33,2 35,2 33,8
miR-181c-5p	34,8 35,5 35,4 34,4	34,2 35,1 34,8 32,9	34,3 32,6 33,3 35,0	34,8 35,6 34,7 34,2	35,0 33,9 33,5 33,1	36,7 / / 35,5	33,9 33,0 35,0 35,6	34,0 35,5 37,3 39,8
let-7a-2-3p	/ 34,5 38,6 36,4	/ 26,1 / 35,4	/ 35,3 35,7 /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /	/ / / /
miR-666-5p	36,4 34,9 34,5 33,7	37,2 33,7 / 33,9	39,0 35,2 35,1 34,6	35,3 / 35,6 34,3	35,1 38,0 34,9 35,5	/ 38,7 35,3 35,7	35,3 35,4 / 35,0	/ / / 39,1
miR-194-5p	23,6 22,4 24,2 24,0	22,9 22,8 23,3 22,6	23,2 22,3 22,7 23,3	22,1 22,8 22,7 23,1	25,9 25,3 26,4 24,9	28,1 27,9 28,4 28,2	28,0 27,7 28,3 28,0	28,1 27,8 28,1 28,4
miR-758-3p	35,3 34,1 35,5 35,1	35,3 35,3 35,2 34,8	34,7 34,5 34,0 34,6	34,8 35,1 34,5 39,0	34,4 34,9 37,3 33,7	36,2 35,3 34,8 35,3	35,5 36,3 35,5 35,3	/ 35,6 37,1 /
miR-667-3p	32,5 32,4 34,4 33,3	33,1 31,6 33,1 30,9	32,2 31,1 31,9 32,1	34,8 34,5 35,4 34,3	30,7 30,3 31,8 30,3	31,7 32,7 32,4 31,8	31,4 32,2 32,4 31,5	32,6 32,6 31,9 32,8
miR-365a-3p	28,9 27,7 28,4 28,3	28,4 28,3 28,2 28,0	28,8 27,7 28,0 28,4	27,4 28,1 28,0 28,2	28,4 28,1 28,9 28,4	31,8 31,7 32,3 32,2	30,9 31,8 31,8 31,3	32,2 32,1 32,0 32,0
miR-29c-3p	26,9 25,2 27,2 26,7	26,7 26,2 26,7 25,8	26,3 25,1 25,5 26,3	26,0 26,4 26,4 26,7	28,5 27,1 29,4 27,3	30,0 31,3 31,2 31,0	29,5 30,1 30,4 29,3	31,3 30,5 31,0 30,4
miR-29c-5p	32,0 31,3 32,8 32,3	32,2 31,6 32,2 31,7	31,9 31,3 31,7 32,4	31,7 32,1 32,4 32,4	32,4 31,9 33,5 33,2	35,0 35,4 35,4 35,5	34,9 34,8 34,3 34,9	35,3 35,4 34,4 35,2
miR-347	23,3 22,1 24,6 24,1	25,2 23,5 24,0 22,5	23,2 23,2 23,4 24,3	23,5 24,2 23,9 24,2	27,0 26,4 27,9 27,2	27,2 27,1 27,4 26,4	27,1 27,3 27,7 27,2	27,3 27,3 26,5 26,5
miR-483-3p	/ / / /	/ / 34,7 35,2	/ 36,4 35,3 34,5	/ / / /	/ 35,8 / 33,6	35,4 36,4 37,8 35,6	34,8 35,9 37,4 33,7	37,7 38,9 35,0 35,2
miR-143-3p	33,3 33,3 32,8 33,5	32,0 30,4 34,2 32,0	32,2 32,5 32,3 29,7	32,0 33,7 34,7 33,3	33,1 34,0 33,8 32,6	34,6 34,2 33,6 34,9	34,9 35,1 34,8 35,0	35,0 35,4 35,2 34,7
miR-433-3p	35,2 35,5 35,6 37,1	36,5 35,0 36,7 33,8	35,4 33,6 35,4 36,7	36,7 / / 34,8	34,9 35,4 35,4 33,2	35,3 35,4 35,3 35,5	34,2 35,1 35,0 34,8	35,1 33,9 33,0 35,0
miR-433-5p	38,7 / / /	36,1 36,9 / /	35,2 35,5 / /	/ 37,8 / /	/ / / /	/ / 36,9 /	/ / / 35,5	/ / / /
miR-19a-3p	27,7 26,7 27,8 27,7	27,2 27,0 27,7 26,9	27,3 26,3 26,8 26,4	26,8 27,0 27,4 27,6	30,3 29,3 30,9 28,9	31,3 32,2 33,2 32,1	29,1 30,4 30,6 29,7	31,8 32,1 31,9 31,8
miR-30d-5p	24,3 23,8 24,6 24,6	23,9 24,2 24,7 23,7	24,1 23,2 24,0 24,0	23,8 24,0 24,0 24,4	25,7 25,9 26,0 25,3	28,7 29,2 29,1 29,1	28,2 28,2 28,7 28,4	29,3 28,8 29,4 29,3
miR-30d-3p	29,9 28,7 30,2 30,2	29,5 29,4 30,1 29,0	29,3 28,8 29,2 29,4	29,0 29,2 29,4 29,7	31,3 30,9 31,7 30,4	32,6 33,3 32,1 32,1	32,0 32,0 32,9 32,5	33,2 32,8 31,7 33,0
miR-152-3p	24,4 24,4 24,5 24,4	23,8 24,4 25,4 23,7	24,1 23,3 23,9 23,5	25,9 24,3 24,4 25,9	26,4 26,2 27,9 25,6	29,5 30,9 30,0 29,8	29,8 29,1 30,3 29,2	32,2 32,4 32,7 30,4
miR-1839-5p	29,3 27,9 29,4 29,3	28,5 28,4 28,7 28,3	28,4 27,8 28,2 28,8	28,0 28,5 28,0 28,8	30,4 30,0 30,3 29,2	34,0 34,5 35,2 35,3	32,6 32,8 34,5 34,1	35,2 34,4 33,8 35,4
miR-32-5p	29,7 28,5 29,1 29,0	29,2 29,1 28,8 28,8	29,5 28,1 28,1 29,5	28,3 28,4 29,3 28,3	32,3 32,0 32,2 31,2	35,2 35,5 35,5 35,4	35,1 35,0 / 34,9	34,5 35,4 34,9 35,5
miR-138-5p	31,2 30,3 31,3 30,6	31,3 31,0 31,4 30,4	31,2 31,0 31,2 31,7	29,3 29,7 29,8 29,3	32,4 32,0 32,0 31,8	33,7 35,6 33,9 35,1	33,9 34,7 34,6 35,5	33,1 33,3 35,6 34,8
miR-29b-1-5p	/ / / /	/ 37,7 / /	34,9 36,0 / /	/ / / /	36,0 37,0 / /	/ / / /	36,0 39,8 / /	37,8 34,5 / /





miR-26a-5p	23,7 24,4	22,7 24,1	23,0 24,2	23,2 22,9	23,0 23,2	22,5 23,4	23,0 23,3	23,1 23,9	25,7 26,1	25,3 24,8	26,6 27,6	27,3 27,1	26,5 27,3	26,4 26,9	27,1 27,1	26,8 27,3	
miR-381-5p	/	/	/	35,2	/	35,3	/	/	/	38,4	/	/	/	/	/	/	
miR-21a-3p	34,0 34,6	35,6 34,2	/	34,8 33,2	35,5 35,4	34,8 35,2	/	34,0 35,6	35,2 /	35,3 35,6	35,0 35,2	33,8 35,4	35,5 38,2	35,6 34,4	34,7 35,2	34,8 36,5	
miR-598-3p	33,9 34,4	32,6 34,7	33,1 33,3	32,7 33,2	33,6 32,7	32,3 32,3	32,8 33,0	33,8 33,3	34,6 34,7	34,1 34,8	34,6 34,6	35,6 33,7	35,2 35,5	35,3 33,9	36,7 33,7	34,6 33,7	
miR-101b-3p	27,2 27,5	26,4 27,4	26,8 27,4	26,8 26,4	27,0 26,7	26,3 27,0	26,4 26,8	26,6 27,2	31,3 31,2	30,0 29,7	33,1 34,1	32,7 33,2	32,3 32,6	33,3 33,9	31,8 33,2	32,9 33,3	
miR-208a-5p	35,4 35,5	35,2 39,4	35,3 35,5	34,5 33,6	35,0 35,3	33,5 32,9	36,8 37,9	39,4 37,6	34,0 35,4	34,2 32,9	35,4 34,3	35,1 37,5	35,3 34,7	37,3 35,1	36,6 34,9	34,9	
miR-338-5p	/	/	/	34,9	36,8	35,3	/	/	/	35,9	38,5	/	/	/	/	/	
miR-759	37,4	/	/	/	34,2	37,3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
miR-324-3p	30,0 30,0	29,2 29,9	29,4 29,8	29,2 26,9	29,6 29,0	28,8 29,2	29,0 29,4	29,8 29,4	29,9 30,2	29,8 29,3	32,4 32,9	32,9 33,0	32,2 32,4	32,6 31,9	32,9 33,0	32,4	
miR-195-5p	33,3 33,1	32,4 33,0	33,3 32,9	32,6 32,0	31,9 32,7	32,0 32,1	33,0 33,6	32,7 34,5	35,5 33,2	33,8 32,4	/	/	35,4 35,4	35,6 35,5	34,6 /	35,5	
miR-151-3p	28,9 29,4	27,9 29,2	28,2 28,5	28,4 28,4	28,5 28,2	27,8 28,8	27,3 28,4	28,4 28,2	29,7 29,6	29,8 29,4	31,6 32,2	32,4 32,4	31,7 31,9	31,3 32,2	32,6 32,4	31,8 32,8	
miR-770-5p	/	/	/	38,4	35,3	39,0	/	/	/	/	39,2	/	/	/	/	/	
miR-129-2-3p	37,6	/	35,4	35,4	38,7	37,7	/	/	/	34,5	35,4	35,5	/	35,6	/	/	
miR-99a-5p	26,4 26,3	25,9 26,4	25,8 26,5	26,1 25,7	26,3 25,9	25,1 26,1	26,3 26,3	26,2 26,9	27,0 27,5	27,2 26,8	29,3 30,2	30,7 30,2	29,1 30,3	29,0 28,9	30,4 30,9	29,8 30,6	
miR-129-5p	35,6	34,8	/	34,7	35,8	35,4	38,1	/	35,4	35,4	39,5	39,4	35,2	37,8	/	35,3	
miR-582-5p	30,9 31,0	30,5 31,4	31,0 31,0	30,2 30,4	31,1 30,1	29,9 30,4	31,3 31,2	30,9 31,5	32,0 34,3	32,2 32,1	35,2 35,7	/	34,3	35,5 35,5	33,7 34,6	/	35,3 35,0
miR-224-5p	35,3	/	36,8	35,6	35,0	35,0	35,4	/	34,7	35,5	/	/	33,7	/	/	/	
miR-33a-5p	30,5 30,0	29,0 29,5	30,5 29,8	29,8 29,2	30,2 28,6	28,4 30,0	29,2 30,4	29,5 29,4	31,9 33,0	30,9 31,1	35,5 33,7	34,7 33,9	34,5 35,4	35,1 33,8	34,6 35,5	34,6 34,8	
miR-511-5p	36,2 39,3	33,6 /	38,0 35,5	35,6 34,7	38,4 35,0	35,4 35,9	35,3 /	38,5 /	35,5 /	/	35,5	32,2	36,6 35,4	35,1 35,4	35,4 34,9	35,9 35,5	
miR-351-5p	32,1 32,2	31,4 31,7	31,9 31,8	32,0 31,3	31,7 31,8	31,0 31,7	30,9 30,6	30,6 30,6	32,5 32,1	32,6 32,0	33,8 34,9	35,4 35,4	31,5 33,4	32,7 34,1	34,4 35,0	34,4 33,8	
miR-497a-5p	33,9 34,8	34,9 35,4	34,1 35,1	34,8 34,3	34,8 33,7	34,4 33,9	35,3 33,9	/	33,6 34,0	32,8 31,9	/	36,7	33,3 35,0	34,9 35,2	/	35,0 39,0	
miR-136-5p	/	/	35,3	37,0	/	/	/	35,8	34,8	35,6	/	35,6	/	/	37,0	/	
cel-miR-39-3p	18,6 21,4	21,9 21,3	18,9 21,4	21,7 21,6	19,0 21,2	21,4 19,0	18,8 19,4	18,9 19,0	20,9 21,3	20,2 20,1	19,7 19,3	20,6 19,3	20,2 21,0	20,3 19,9	21,0 21,2	21,0 21,3	
Unisp3	20,8 20,8	20,3 20,4	20,7 20,8	20,7 20,6	20,7 20,7	20,8 20,8	20,8 20,7	20,6 20,8	20,6 20,8	20,3 20,3	20,9 20,8	20,9 21,0	21,0 20,9	20,9 21,0	20,8 21,1	20,9 20,9	
UniSp6	18,7 18,8	18,6 18,7	18,6 18,7	18,8 18,7	18,7 18,8	18,8 18,7	18,7 18,7	18,7 18,7	18,6 18,7	18,7 18,5	18,5 18,3	18,6 18,2	18,3 18,4	18,4 18,5	18,6 18,3	18,6 18,5	

### ANHANG-TABELLE 31: ERGEBNISSE DES miRNA-PROFILING IN FETTLLEIBIGEN ZSF1-RATTEN VERGLEICHEN ZUR SCHLANKEN KONTROLLE

Signifikant veränderter miRNAs im Urin und Urin-EVs fettleibiger und schlanker ZSF1-Ratten im Alter von 22 oder 26 Wochen (n=4). Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur schlanken Kontrolle. Es sind relative Mengen in fettleibigen ZSF1-Ratten relative zum Mittelwert der Kontrolle gezeigt. EV: Extrazelluläre Vesikel. W: Woche. OvL: Fettleibig relativ zu schlank. FDR: engl. *False discovery rate*. miR: microRNA. MW: Mittelwert.

miRNA	EV-Profilung						Gesamturin-Profilung					
	ZSF1 OvL, Woche 22						ZSF1 OvL, Woche 26					
	#1	#2	#3	#4	MW	p-Wert	#1	#2	#3	#4	MW	p-Wert
let-7a-1-3p	2,04	1,89	2,29	2,07	<b>2,08 *</b>	0,000	4,30	2,61	2,13	2,76	<b>3,12 *</b>	0,008
let-7a-5p	3,42	2,90	2,21	2,70	<b>2,84 *</b>	0,001	10,66	7,65	7,89	12,55	<b>9,90 *</b>	0,000
let-7b-3p	2,21	2,66	2,59	2,29	<b>2,45 *</b>	0,000	8,16	5,48	3,74	6,48	<b>6,53 *</b>	0,001
let-7b-5p	3,75	3,58	2,22	3,09	<b>3,22 *</b>	0,001	13,12	9,99	9,65	15,07	<b>12,05 *</b>	0,000
let-7c-5p	4,07	4,13	2,13	4,32	<b>3,69 *</b>	0,002	12,42	9,86	8,66	18,90	<b>12,68 *</b>	0,000
let-7d-3p	2,08	1,86	1,87	1,70	<b>1,91</b>	0,001	5,50	4,92	3,46	5,91	<b>4,92 *</b>	0,000

let-7d-5p	2,36	2,70	2,22	2,42	<b>2,47 *</b>	0,000	6,68	5,43	4,24	11,66	<b>6,59 *</b>	0,010
let-7e-3p	2,56	3,34	2,69	1,82	<b>2,70 *</b>	0,005	0,65	8,54	2,42	4,12	<b>3,12</b>	0,000
let-7e-5p	2,30	3,03	2,15	2,55	<b>2,57 *</b>	0,001	12,51	7,72	6,46	10,02	<b>9,53 *</b>	0,000
let-7f-1-3p	2,48	2,50	1,99	1,41	<b>2,06 *</b>	0,003	2,75	3,12	1,83	3,76	<b>2,89 *</b>	0,004
let-7f-2-3p	2,90	5,49	2,72	2,67	<b>3,30 *</b>	0,001	6,45	6,21	4,30	1,62	<b>4,73 *</b>	0,013
let-7f-5p	3,00	3,70	2,47	2,62	<b>2,96 *</b>	0,000	10,76	6,30	7,29	10,48	<b>8,87 *</b>	0,000
let-7i-5p	3,51	4,00	2,81	3,80	<b>3,56 *</b>	0,000	16,94	9,07	7,16	20,77	<b>12,71 *</b>	0,000
miR-100-5p	4,45	2,40	4,25	2,72	<b>3,49 *</b>	0,002	1,04	2,44	6,00	1,37	<b>2,4</b>	0,192
miR-101-3p	2,11	2,36	2,27	2,19	<b>2,26 *</b>	0,000	5,70	4,70	3,02	6,07	<b>4,82 *</b>	0,000
miR-101a-5p	2,76	3,35	2,07	2,06	<b>2,52 *</b>	0,000	3,46	3,41	3,94	5,11	<b>4,78 *</b>	0,007
miR-101b-3p	2,47	2,53	1,94	2,35	<b>2,34 *</b>	0,000	4,15	1,64	3,21	1,34	<b>2,53 *</b>	0,039
miR-103a-3p	2,44	3,09	2,63	1,83	<b>2,50 *</b>	0,001	5,82	4,10	3,66	6,01	<b>4,93 *</b>	0,000
miR-106b-3p	3,35	3,30	2,94	2,37	<b>3,07 *</b>	0,001	4,90	3,51	1,65	1,85	<b>2,82 *</b>	0,016
miR-106b-5p	2,48	3,59	3,00	3,05	<b>3,03 *</b>	0,000	14,16	8,61	12,57	16,21	<b>14,27 *</b>	0,000
miR-107	2,32	2,85	2,75	2,77	<b>2,71 *</b>	0,000	6,13	4,44	3,84	6,06	<b>5,18 *</b>	0,000
miR-10a-3p	2,16	3,32	2,38	5,33	<b>3,41 *</b>	0,011	2,63	1,78	3,53	2,25	<b>3,72</b>	0,056
miR-10a-5p	2,43	2,59	1,33	2,51	<b>2,20 *</b>	0,009	1,85	1,99	1,42	2,70	<b>2,54</b>	0,075
miR-10b-5p	2,75	3,91	2,03	2,88	<b>2,89 *</b>	0,002	10,92	9,58	3,90	7,94	<b>7,61 *</b>	0,000
miR-1188-5p	3,98	9,96	2,40	5,23	<b>4,82 *</b>	0,003	3,02	2,49	3,10	3,13	<b>2,94</b>	0,093
miR-122-5p	0,55	1,91	3,09	1,51	<b>2,49</b>	0,356	20,18	5,65	5,03	41,76	<b>19,64 *</b>	0,007
miR-124-3p	2,97	51,69	3,58	178,19	<b>22,22 *</b>	0,029	10,95	6,26	2,77	6,25	<b>6,44 *</b>	0,002
miR-1249-3p	2,39	3,44	2,93	2,64	<b>2,93 *</b>	0,001	2,61	1,83	2,03	3,76	<b>2,60 *</b>	0,008
miR-125a-3p	2,70	2,90	1,54	2,06	<b>2,31 *</b>	0,007	4,25	4,85	6,26	3,34	<b>5,03 *</b>	0,002
miR-125a-5p	2,18	2,04	1,86	2,26	<b>2,10 *</b>	0,000	6,26	5,14	5,09	5,67	<b>5,65 *</b>	0,000
miR-125b-1-3p	2,55	13,11	2,85	112,64	<b>10,21</b>	0,279	4,84	3,64	4,27	6,76	<b>5,76 *</b>	0,004
miR-125b-2-3p	9,90	2,51	2,15	10,37	<b>4,93 *</b>	0,011	6,54	1,67	5,92	8,41	<b>5,36 *</b>	0,010
miR-125b-5p	3,50	3,53	2,47	3,10	<b>3,16 *</b>	0,000	15,63	12,44	8,77	13,39	<b>12,33 *</b>	0,000
miR-126-3p	9,46	8,49	6,85	8,19	<b>8,79 *</b>	0,000	3,36	2,36	2,42	1,74	<b>2,58 *</b>	0,010
miR-126-5p	2,15	1,89	2,20	2,02	<b>2,08 *</b>	0,000	8,45	1,98	2,46	7,85	<b>4,53</b>	0,052
miR-128-3p	2,00	3,41	4,08	3,33	<b>3,38 *</b>	0,005	1,46	0,85	1,55	3,95	<b>2,40</b>	0,249
miR-129-2-3p	5,35	5,74	1,90	5,81	<b>4,94 *</b>	0,007	3,02	6,76	9,92	17,08	<b>7,72</b>	0,033
miR-129-5p	1,81	10,00	9,08	1,43	<b>4,26 *</b>	0,042	7,60	1,74	2,16	2,18	<b>3,06</b>	0,139
miR-130a-3p	1,51	2,59	1,83	2,23	<b>2,03 *</b>	0,004	4,68	3,32	2,98	4,84	<b>3,89 *</b>	0,000
miR-130b-3p	1,76	4,00	2,33	6,43	<b>3,23 *</b>	0,008	8,46	3,28	3,70	5,31	<b>5,43 *</b>	0,003
miR-132-3p	1,98	3,07	1,28	2,20	<b>2,13 *</b>	0,025	14,04	3,02	5,59	3,73	<b>6,19 *</b>	0,007
miR-133a-3p	4,06	3,65	12,86	11,70	<b>6,99 *</b>	0,001	2,44	2,75	3,36	2,53	<b>2,85 *</b>	0,001
miR-133b	1,01	2,29	2,35	1,38	<b>1,71</b>	0,086	1,96	1,88	2,41	1,86	<b>2,15 *</b>	0,012
miR-135a-3p	1,57	2,06	2,20	4,30	<b>2,56 *</b>	0,023	6,45	4,40	2,03	5,59	<b>5,50 *</b>	0,015
miR-135a-5p	1,26	1,54	1,37	1,50	<b>1,44</b>	0,029	3,64	3,71	3,46	2,50	<b>3,44 *</b>	0,001
miR-135b-5p	2,00	3,90	2,68	4,58	<b>3,31 *</b>	0,005	2,10	5,05	2,15	8,02	<b>4,13</b>	0,060
miR-137	2,71	2,82	3,17	5,97	<b>3,63 *</b>	0,003	3,02	2,49	3,10	147,01	<b>7,71</b>	0,333
miR-139-3p	2,79	6,61	7,23	23,25	<b>7,51 *</b>	0,004	3,84	2,49	4,62	3,05	<b>3,63 *</b>	0,002
miR-139-5p	16,16	5,56	6,25	5,96	<b>10,88 *</b>	0,005	5,96	2,60	1,92	7,10	<b>4,62 *</b>	0,016
miR-140-3p	3,54	3,28	2,35	2,46	<b>2,91 *</b>	0,000	4,93	3,70	3,13	3,02	<b>3,89 *</b>	0,001
miR-140-5p	2,31	2,79	2,67	2,53	<b>2,58 *</b>	0,000	9,00	5,51	2,63	11,00	<b>6,41 *</b>	0,002
miR-141-3p	4,81	3,37	1,90	3,72	<b>3,87 *</b>	0,016	11,58	9,58	5,95	12,01	<b>14,96 *</b>	0,002
miR-142-3p	0,16	0,45	0,52	0,15	<b>3,34</b>	0,513	6,24	2,02	10,62	14,98	<b>8,04 *</b>	0,012
miR-142-5p	1,20	0,81	6,96	0,63	<b>2,09</b>	0,422	6,58	3,82	59,84	6,48	<b>10,88 *</b>	0,011
miR-143-3p	5,78	17,47	1,39	3,88	<b>5,94 *</b>	0,033	3,51	2,34	3,62	3,28	<b>3,25 *</b>	0,001
miR-145-5p	3,27	2,39	2,60	2,84	<b>2,76 *</b>	0,000	7,52	4,88	8,57	5,72	<b>8,47 *</b>	0,002
miR-146a-5p	2,16	344,36	7,48	8,21	<b>15,11 *</b>	0,049	4,90	9,43	5,83	3,56	<b>7,33 *</b>	0,007
miR-146b-5p	3,42	3,21	2,27	2,76	<b>2,93 *</b>	0,000	11,49	4,83	5,48	28,60	<b>11,63 *</b>	0,003
miR-148b-3p	2,73	2,43	2,81	2,65	<b>2,73 *</b>	0,000	5,52	5,48	2,34	5,98	<b>4,58 *</b>	0,001
miR-148b-5p	2,42	3,04	1,97	2,50	<b>2,95 *</b>	0,027	1,60	1,32	4,94	3,81	<b>2,78 *</b>	0,050
miR-150-5p	1,84	2,39	1,66	2,11	<b>2,61</b>	0,092	8,87	8,29	25,01	10,58	<b>13,52 *</b>	0,001
miR-151-3p	2,22	2,03	2,13	1,40	<b>1,99</b>	0,010	4,98	5,31	4,33	3,66	<b>4,65 *</b>	0,000
miR-151a-5p	3,06	2,76	2,50	2,57	<b>2,76 *</b>	0,000	7,45	6,15	4,94	6,88	<b>6,33 *</b>	0,000
miR-152-3p	5,75	3,93	2,15	4,14	<b>4,31 *</b>	0,007	11,20	13,91	7,46	16,72	<b>14,9 *</b>	0,001
miR-154-5p	2,64	4,40	3,24	1,20	<b>2,70 *</b>	0,021	3,78	0,99	1,23	1,25	<b>1,89</b>	0,315
miR-155-5p	2,66	3,28	5,29	2,81	<b>3,44 *</b>	0,001	3,55	7,99	3,24	7,50	<b>5,92 *</b>	0,005

miR-15b-3p	2,30	3,42	1,91	2,41	<b>2,52 *</b>	0,002	4,14	2,41	8,55	2,56	<b>4,30 *</b>	0,011
miR-15b-5p	2,85	4,70	1,86	4,18	<b>3,54 *</b>	0,011	17,21	6,83	6,17	11,54	<b>10,61 *</b>	0,001
miR-16-5p	3,89	3,12	2,82	3,76	<b>3,47 *</b>	0,000	13,73	8,35	9,95	15,16	<b>11,77 *</b>	0,000
miR-17-1-3p	2,61	2,22	2,49	2,26	<b>2,45 *</b>	0,000	2,96	1,83	5,30	2,66	<b>3,73 *</b>	0,033
miR-17-5p	2,76	3,33	2,42	2,75	<b>2,84 *</b>	0,000	7,35	7,10	5,58	10,05	<b>7,44 *</b>	0,000
miR-181a-3p	1,97	2,05	1,50	3,12	<b>2,18 *</b>	0,015	2,30	0,52	2,04	1,89	<b>2,31</b>	0,356
miR-181a-5p	1,71	1,57	1,95	1,37	<b>1,69 *</b>	0,015	2,93	3,37	2,14	2,61	<b>2,76 *</b>	0,000
miR-181b-5p	2,47	2,47	1,90	2,08	<b>2,27 *</b>	0,001	3,38	3,02	3,07	4,61	<b>3,48 *</b>	0,000
miR-181c-5p	3,67	2,13	2,76	6,56	<b>3,70 *</b>	0,007	8,85	13,5 2	4,24	2,82	<b>8,79 *</b>	0,010
miR-181d-5p	5,13	1,51	1,44	5,53	<b>2,83 *</b>	0,034	3,38	4,90	4,49	3,19	<b>6,05 *</b>	0,022
miR-182-5p	1,41	1,43	1,06	1,04	<b>1,25</b>	0,192	2,32	2,69	2,36	2,53	<b>2,53 *</b>	0,001
miR-183-5p	1,47	1,48	1,18	1,29	<b>1,36</b>	0,014	4,01	3,51	2,09	2,46	<b>2,96 *</b>	0,001
miR-1839-5p	2,31	2,53	2,35	1,81	<b>2,27 *</b>	0,001	11,29	7,97	3,02	4,18	<b>6,77 *</b>	0,004
miR-184	61,8 0	87,39	57,8 5	36,44	<b>59,56 *</b>	0,000	33,79	35,9 4	39,42	14,60	<b>30,99 *</b>	0,000
miR-186-5p	2,27	3,60	1,77	2,41	<b>2,48 *</b>	0,003	4,19	3,01	1,39	2,29	<b>2,70 *</b>	0,022
miR-187-3p	3,06	2,48	2,41	2,61	<b>2,70 *</b>	0,000	3,71	2,42	2,93	1,32	<b>2,82 *</b>	0,035
miR-188-5p	3,11	384,9 3	19,4 7	274,6 6	<b>54,54 *</b>	0,014	3,90	3,23	13,24	4,10	<b>6,40 *</b>	0,011
miR-18a-5p	2,52	2,37	2,02	1,62	<b>2,33 *</b>	0,024	2,52	1,41	3,56	2,29	<b>3,94</b>	0,072
miR-190a-5p	2,74	2,57	3,55	3,17	<b>3,03 *</b>	0,000	6,18	3,47	4,88	4,94	<b>5,35 *</b>	0,001
miR-190b-5p	1,51	1,91	4,87	5,84	<b>3,79 *</b>	0,036	13,93	6,98	3,10	11,74	<b>7,76</b>	0,176
miR-191-3p	3,39	4,12	4,49	2,69	<b>4,09 *</b>	0,007	6,42	2,09	2,01	5,49	<b>4,99 *</b>	0,030
miR-191-5p	2,58	2,79	2,02	2,30	<b>2,44 *</b>	0,000	5,94	5,68	3,68	5,03	<b>5,04 *</b>	0,000
miR-192-5p	2,06	2,12	1,90	1,53	<b>1,95</b>	0,005	3,16	3,74	3,05	3,53	<b>3,43 *</b>	0,000
miR-193a-5p	2,79	2,11	1,94	2,75	<b>2,43 *</b>	0,002	2,16	2,35	1,45	3,10	<b>2,30 *</b>	0,014
miR-194-5p	2,23	2,45	1,88	1,86	<b>2,13 *</b>	0,001	3,38	3,30	2,64	3,30	<b>3,18 *</b>	0,000
miR-195-5p	2,69	4,52	4,01	4,68	<b>4,25 *</b>	0,002	4,24	2,89	4,22	3,81	<b>4,58 *</b>	0,006
miR-196a-5p	1,83	2,50	1,32	1,93	<b>1,92</b>	0,020	7,78	1,84	1,56	3,68	<b>3,18 *</b>	0,031
miR-196b-5p	2,54	2,03	1,89	2,21	<b>2,19 *</b>	0,001	4,90	3,25	4,81	5,07	<b>5,06 *</b>	0,002
miR-196c-5p	2,80	2,75	3,32	3,43	<b>3,29 *</b>	0,002	3,71	2,76	5,24	3,97	<b>3,90 *</b>	0,000
miR-199a-3p	5,74	2,02	2,06	3,02	<b>2,99 *</b>	0,008	3,57	2,96	5,58	4,03	<b>5,16 *</b>	0,011
miR-19a-3p	2,57	3,08	2,18	2,31	<b>2,54 *</b>	0,000	21,29	7,07	7,45	14,41	<b>11,52 *</b>	0,000
miR-19b-3p	3,18	2,88	2,29	2,27	<b>2,65 *</b>	0,000	19,12	6,51	9,74	14,67	<b>11,88 *</b>	0,000
miR-200a-3p	3,44	2,97	2,13	2,83	<b>3,02 *</b>	0,005	9,58	8,94	5,95	11,92	<b>12,46 *</b>	0,002
miR-200b-3p	3,96	3,44	1,91	3,71	<b>3,39 *</b>	0,005	9,90	11,9 0	5,51	13,50	<b>12,73 *</b>	0,001
miR-200b-5p	4,06	3,04	2,21	2,84	<b>3,18 *</b>	0,004	7,00	6,39	4,74	8,59	<b>7,17 *</b>	0,000
miR-200c-3p	6,41	3,41	1,85	4,64	<b>4,26 *</b>	0,014	14,14	16,6 5	7,38	16,85	<b>22,25 *</b>	0,002
miR-203a-3p	1,56	1,57	1,50	1,36	<b>1,54</b>	0,003	4,20	4,51	2,78	2,88	<b>3,63 *</b>	0,001
miR-204-3p	2,89	3,92	3,91	1,97	<b>3,22 *</b>	0,000	2,07	2,17	1,22	1,97	<b>2,39</b>	0,132
miR-204-5p	3,00	2,94	2,61	2,24	<b>2,73 *</b>	0,000	5,61	6,65	3,80	7,69	<b>5,87 *</b>	0,000
miR-205-5p	4,39	4,18	3,35	4,02	<b>4,23 *</b>	0,043	10,56	6,76	10,13	8,77	<b>9,86 *</b>	0,000
miR-208a-3p	2,47	6,44	1,26	5,16	<b>3,92 *</b>	0,000	5,68	2,38	2,40	2,82	<b>3,32 *</b>	0,006
miR-208a-5p	8,51	15,23	8,62	18,44	<b>11,99 *</b>	0,001	4,13	3,01	1,12	5,70	<b>3,87</b>	0,052
miR-20a-5p	2,35	2,55	2,04	2,32	<b>2,37 *</b>	0,003	9,90	7,55	4,77	8,73	<b>7,60 *</b>	0,000
miR-210-3p	1,62	1,89	1,41	3,00	<b>1,98</b>	0,050	5,38	4,33	3,60	5,10	<b>4,95 *</b>	0,001
miR-211-5p	3,40	2,95	2,14	2,67	<b>3,13 *</b>	0,013	26,61	21,7 3	8,68	35,44	<b>20,67 *</b>	0,000
miR-212-3p	0,49	12,42	8,53	18,97	<b>6,67</b>	0,057	4,69	3,66	2,15	3,23	<b>3,32 *</b>	0,000
miR-214-3p	5,47	29,77	3,08	15,92	<b>11,48 *</b>	0,008	13,68	3,41	2,66	11,70	<b>6,44 *</b>	0,006
miR-215	4,65	2,97	4,23	6,37	<b>4,62 *</b>	0,001	1,90	3,74	2,59	3,22	<b>3,22 *</b>	0,014
miR-21-5p	2,15	1,87	1,42	1,61	<b>1,94</b>	0,041	8,08	6,08	5,23	6,91	<b>8,92 *</b>	0,002
miR-216b-5p	5,21	8,16	1,87	21,97	<b>7,49 *</b>	0,014	12,46	1,00	3,80	3,44	<b>4,07</b>	0,148
miR-218-5p	1,94	2,16	2,08	1,65	<b>1,98</b>	0,001	5,17	6,29	3,47	8,44	<b>5,71 *</b>	0,000
miR-219a-1-3p	4,13	16,55	4,28	366,8 3	<b>20,55 *</b>	0,034	15,34	2,11	4,68	2,67	<b>4,53 *</b>	0,015
miR-219a-2-3p	3,86	4,99	3,85	4,65	<b>4,49 *</b>	0,000	5,33	4,05	2,86	5,33	<b>4,77 *</b>	0,002
miR-219a-5p	2,48	3,92	3,16	3,17	<b>3,24 *</b>	0,001	9,96	11,0 1	3,43	2,95	<b>6,62 *</b>	0,006
miR-221-3p	3,19	3,30	2,64	3,48	<b>3,25 *</b>	0,000	7,50	5,29	4,20	11,15	<b>7,09 *</b>	0,001
miR-222-3p	2,65	1,99	1,69	2,33	<b>2,20 *</b>	0,003	3,84	3,48	5,43	3,95	<b>4,79 *</b>	0,004
miR-223-3p	0,30	1,58	8,12	0,74	<b>5,37</b>	0,438	19,01	25,3 8	128,4 5	3,57	<b>25,34 *</b>	0,007
miR-22-3p	1,49	1,98	1,89	2,13	<b>1,91</b>	0,003	3,57	2,38	3,15	4,91	<b>3,42 *</b>	0,000
miR-22-5p	1,42	1,19	2,25	2,04	<b>1,74</b>	0,052	2,06	4,18	6,68	4,36	<b>4,15 *</b>	0,003

miR-23a-3p	1,89	2,04	1,70	1,89	<b>1,89</b>	0,000	8,30	6,36	5,29	5,55	<b>6,49 *</b>	0,000
miR-23a-5p	0,99	35,16	5,38	15,57	<b>11,63 *</b>	0,037	6,92	1,99	2,44	1,62	<b>3,34 *</b>	0,049
miR-23b-3p	1,20	1,34	1,05	1,34	<b>1,23</b>	0,031	3,35	3,00	1,72	2,28	<b>2,53 *</b>	0,002
miR-24-3p	1,54	1,62	1,31	1,47	<b>1,48</b>	0,001	6,89	4,46	5,64	6,35	<b>5,79 *</b>	0,000
miR-25-3p	3,27	3,71	1,83	2,66	<b>2,90 *</b>	0,003	10,74	7,87	6,70	10,22	<b>8,77 *</b>	0,000
miR-25-5p	2,44	9,78	2,98	89,95	<b>9,79 *</b>	0,038	3,48	13,07	3,06	4,28	<b>5,97 *</b>	0,012
miR-26a-5p	3,14	2,84	1,62	2,40	<b>2,47 *</b>	0,003	4,78	3,85	2,70	3,58	<b>3,70 *</b>	0,000
miR-26b-3p	1,57	3,04	1,86	1,89	<b>2,04 *</b>	0,004	3,01	1,99	2,09	3,49	<b>2,80 *</b>	0,010
miR-26b-5p	2,15	3,91	1,88	2,86	<b>2,66 *</b>	0,004	5,41	5,51	3,97	6,51	<b>5,41 *</b>	0,000
miR-27a-3p	1,69	2,13	1,41	1,85	<b>1,77</b>	0,004	5,85	4,23	5,20	4,65	<b>5,00 *</b>	0,000
miR-27a-5p	1,93	1,66	1,92	1,89	<b>1,93</b>	0,002	4,74	2,31	2,84	4,35	<b>3,69 *</b>	0,003
miR-27b-3p	1,37	1,46	1,17	1,39	<b>1,35</b>	0,005	4,96	4,01	4,15	4,23	<b>4,35 *</b>	0,000
miR-28-3p	2,74	2,52	1,89	1,79	<b>2,26 *</b>	0,003	2,97	4,66	3,08	3,87	<b>3,59 *</b>	0,000
miR-28-5p	2,59	3,08	2,73	2,21	<b>2,69 *</b>	0,000	6,20	9,62	6,13	10,25	<b>7,88 *</b>	0,000
miR-290	2,07	3,60	2,44	5,47	<b>3,81 *</b>	0,023	3,02	2,49	8,70	3,13	<b>3,81</b>	0,063
miR-291a-3p	17,89	74,05	2,84	8,02	<b>20,18 *</b>	0,012	12,14	2,74	5,99	6,14	<b>7,45 *</b>	0,011
miR-291a-5p	2,53	4,93	3,22	14,64	<b>4,99 *</b>	0,007	8,16	1,77	4,01	4,92	<b>5,65 *</b>	0,022
miR-295-5p	2,00	8,31	3,08	13,59	<b>5,47 *</b>	0,013	3,02	2,49	3,10	5,41	<b>3,38</b>	0,080
miR-296-5p	2,98	0,86	0,89	103,26	<b>5,74</b>	0,346	34,08	1,04	5,22	23,87	<b>9,85 *</b>	0,040
miR-29a-3p	2,35	3,18	2,48	2,64	<b>2,68 *</b>	0,000	7,88	5,17	4,30	10,74	<b>6,83 *</b>	0,000
miR-29a-5p	2,44	2,43	1,90	2,07	<b>2,23 *</b>	0,000	1,29	3,61	1,30	2,38	<b>1,97</b>	0,088
miR-29b-3p	2,20	2,68	2,17	2,30	<b>2,35 *</b>	0,000	5,10	4,80	3,27	6,85	<b>5,01 *</b>	0,000
miR-29c-3p	2,10	3,04	2,42	2,62	<b>2,54 *</b>	0,000	7,33	3,88	3,98	8,59	<b>5,75 *</b>	0,000
miR-29c-5p	2,52	3,93	2,82	2,51	<b>2,92 *</b>	0,000	3,15	2,70	4,71	3,29	<b>3,77 *</b>	0,003
miR-301a-3p	2,14	2,41	3,17	1,89	<b>2,42 *</b>	0,002	5,79	5,64	3,59	6,63	<b>5,66 *</b>	0,001
miR-301a-5p	3,72	3,43	3,29	1,52	<b>3,05 *</b>	0,011	6,54	1,68	8,39	2,11	<b>4,26</b>	0,072
miR-301b-3p	2,80	2,87	1,25	1,96	<b>2,19 *</b>	0,020	1,55	1,71	2,56	5,37	<b>3,01 *</b>	0,049
miR-30a-3p	2,33	1,95	2,29	1,89	<b>2,14 *</b>	0,000	5,96	5,43	3,37	4,89	<b>4,83 *</b>	0,000
miR-30a-5p	2,13	2,38	1,57	1,85	<b>1,98</b>	0,002	5,33	2,90	3,53	3,60	<b>3,86 *</b>	0,000
miR-30b-5p	2,64	2,31	1,74	2,42	<b>2,28 *</b>	0,001	7,65	5,20	3,76	5,86	<b>5,71 *</b>	0,000
miR-30c-1-3p	5,53	4,89	4,88	5,52	<b>5,54 *</b>	0,000	13,19	5,23	4,81	5,50	<b>7,34</b>	0,002
miR-30c-2-3p	2,13	3,14	2,26	2,49	<b>2,53 *</b>	0,001	7,42	3,61	1,84	2,42	<b>3,48 *</b>	0,013
miR-30c-5p	2,22	2,09	2,03	1,83	<b>2,06 *</b>	0,000	3,51	3,31	2,87	3,64	<b>3,35 *</b>	0,000
miR-30d-3p	2,18	2,59	1,78	2,27	<b>2,20 *</b>	0,000	4,22	3,36	2,23	3,10	<b>3,79 *</b>	0,009
miR-30d-5p	2,79	2,48	1,91	2,28	<b>2,35 *</b>	0,000	6,52	4,89	4,34	5,76	<b>5,34 *</b>	0,000
miR-30e-3p	2,25	2,26	1,72	1,72	<b>2,00</b>	0,002	6,93	4,87	3,74	6,74	<b>5,56 *</b>	0,000
miR-30e-5p	2,19	2,54	2,39	1,89	<b>2,26 *</b>	0,000	5,51	2,78	3,40	3,18	<b>3,67 *</b>	0,000
miR-31-3p	4,25	3,07	1,62	3,27	<b>2,95 *</b>	0,004	11,47	7,59	4,54	4,12	<b>7,71 *</b>	0,004
miR-31-5p	3,11	2,94	2,09	2,44	<b>2,75 *</b>	0,003	12,49	9,98	9,50	8,83	<b>10,38 *</b>	0,000
miR-320a	2,39	2,86	2,15	2,41	<b>2,53 *</b>	0,001	5,08	4,46	3,18	3,88	<b>4,16 *</b>	0,000
miR-322-3p	0,57	1,28	0,77	4,43	<b>1,26</b>	0,431	5,96	4,85	3,71	3,92	<b>4,57 *</b>	0,000
miR-322-5p	2,40	2,86	2,82	2,83	<b>2,74 *</b>	0,000	4,14	6,60	7,97	7,43	<b>7,15 *</b>	0,001
miR-323a-5p	15,72	14,62	4,24	4,80	<b>8,27 *</b>	0,001	1,66	1,37	1,70	1,72	<b>1,85</b>	0,118
miR-324-3p	2,55	2,91	2,21	10,08	<b>3,64 *</b>	0,012	4,99	3,04	4,26	6,18	<b>4,52 *</b>	0,000
miR-324-5p	2,55	2,90	2,84	2,01	<b>2,62 *</b>	0,001	5,64	3,39	5,27	6,90	<b>6,11 *</b>	0,003
miR-325-3p	2,60	2,25	1,82	2,72	<b>2,82 *</b>	0,033	10,41	4,38	1,80	4,67	<b>4,82 *</b>	0,012
miR-326-3p	2,29	5,78	4,09	5,88	<b>4,73 *</b>	0,005	3,70	3,18	4,65	2,43	<b>3,63 *</b>	0,002
miR-327	1,32	4,60	4,88	50,78	<b>8,25 *</b>	0,049	3,02	2,49	3,10	13,88	<b>4,27</b>	0,144
miR-328-3p	2,05	2,12	1,94	1,75	<b>2,00 *</b>	0,000	3,84	3,88	3,69	3,46	<b>3,80</b>	0,000
miR-330-3p	2,93	2,31	2,29	1,87	<b>2,42 *</b>	0,004	7,83	3,59	4,15	2,91	<b>4,71 *</b>	0,004
miR-330-5p	2,29	3,36	1,91	3,15	<b>2,66 *</b>	0,002	3,95	2,30	2,67	2,77	<b>2,88 *</b>	0,000
miR-331-3p	2,15	2,62	2,48	2,01	<b>2,31 *</b>	0,000	7,70	4,42	5,30	4,98	<b>5,76 *</b>	0,000
miR-335-5p	11,11	8,08	4,46	7,65	<b>7,99 *</b>	0,000	6,33	5,37	7,64	3,59	<b>6,49 *</b>	0,003
miR-339-3p	2,66	3,34	3,01	2,31	<b>2,83 *</b>	0,000	4,57	3,79	2,47	3,51	<b>3,99 *</b>	0,006
miR-339-5p	2,65	2,11	2,52	1,71	<b>2,24 *</b>	0,001	7,74	5,71	5,67	6,74	<b>6,44 *</b>	0,000
miR-33a-5p	1,36	2,26	2,66	2,31	<b>2,17 *</b>	0,014	4,12	2,11	2,23	6,68	<b>3,40</b>	0,005
miR-340-3p	4,02	3,01	2,46	2,21	<b>2,96 *</b>	0,002	3,14	3,33	8,80	3,63	<b>4,69 *</b>	0,005
miR-340-5p	1,78	4,47	3,90	2,60	<b>3,11 *</b>	0,005	8,27	8,13	7,24	2,08	<b>6,47 *</b>	0,005
miR-342-3p	6,19	5,91	5,33	5,59	<b>5,83 *</b>	0,000	8,79	9,73	8,58	7,81	<b>8,96 *</b>	0,000
miR-342-5p	1,95	2,50	2,72	1,16	<b>2,27</b>	0,052	10,60	7,09	9,12	9,82	<b>9,12 *</b>	0,000
miR-344a-3p	8,90	6,85	6,45	22,47	<b>11,18 *</b>	0,001	1,33	9,15	1,36	1,38	<b>2,77</b>	0,290
miR-345-3p	1,96	4,13	2,44	2,69	<b>2,78 *</b>	0,003	2,59	1,43	0,62	3,04	<b>1,69</b>	0,159
miR-345-5p	1,48	1,71	1,88	1,57	<b>1,68</b>	0,002	4,31	3,16	2,82	3,78	<b>3,50 *</b>	0,000
miR-346	0,76	3,98	0,86	2,79	<b>2,00</b>	0,237	3,06	1,59	2,00	5,20	<b>2,96 *</b>	0,025

miR-347	1,10	3,51	2,79	4,98	<b>2,73 *</b>	0,023	2,54	1,71	1,69	2,39	<b>2,25 *</b>	0,027
miR-34a-5p	7,43	11,17	11,73	8,79	<b>9,94 *</b>	0,000	12,79	6,34	10,11	16,24	<b>11,90 *</b>	0,000
miR-34b-3p	15,78	1,86	2,86	1,56	<b>4,18</b>	0,238	97,47	6,85	23,88	50,66	<b>44,98 *</b>	0,002
miR-34b-5p	5,84	1,13	5,20	2,00	<b>3,72</b>	0,084	23,64	7,40	4,97	14,99	<b>12,16 *</b>	0,002
miR-34c-3p	9,66	2,40	2,27	9,57	<b>5,06 *</b>	0,012	60,27	2,89	14,35	18,92	<b>15,20 *</b>	0,005
miR-34c-5p	10,95	2,17	3,79	1,67	<b>4,55</b>	0,144	58,59	4,75	12,45	31,57	<b>28,10 *</b>	0,004
miR-350	3,07	2,66	2,57	2,36	<b>2,68 *</b>	0,000	2,12	5,48	4,26	2,72	<b>4,21 *</b>	0,017
miR-351-5p	1,11	1,02	1,34	1,15	<b>1,16</b>	0,192	22,81	7,58	6,03	3,87	<b>8,23 *</b>	0,002
miR-352	2,56	3,48	1,99	3,50	<b>2,94 *</b>	0,003	6,69	4,17	3,29	6,64	<b>5,17 *</b>	0,000
miR-361-5p	2,42	2,36	1,94	1,75	<b>2,14 *</b>	0,002	5,31	3,69	3,51	3,53	<b>4,07 *</b>	0,000
miR-362-3p	1,98	3,87	4,04	2,76	<b>3,20 *</b>	0,004	9,17	7,31	4,47	3,12	<b>7,74 *</b>	0,008
miR-362-5p	2,35	5,10	2,14	1,48	<b>2,64 *</b>	0,027	4,60	4,15	1,55	5,23	<b>4,01 *</b>	0,014
miR-365a-3p	1,84	2,00	2,46	1,63	<b>1,99</b>	0,003	7,12	2,94	3,58	5,25	<b>4,59 *</b>	0,001
miR-369-5p	1,79	0,69	3,23	5,78	<b>3,25</b>	0,178	5,77	1,73	6,35	9,24	<b>5,58 *</b>	0,009
miR-374b-5p	3,74	3,07	2,03	2,78	<b>2,90 *</b>	0,001	8,15	6,44	4,97	8,64	<b>7,48 *</b>	0,000
miR-375	5,36	3,67	2,43	4,10	<b>3,83 *</b>	0,001	11,34	7,88	6,17	9,72	<b>8,89 *</b>	0,000
miR-376a-3p	2,89	7,00	3,51	4,43	<b>6,85 *</b>	0,013	13,07	2,49	3,10	8,67	<b>5,48</b>	0,058
miR-376b-3p	6,93	486,56	3,38	14,13	<b>33,41 *</b>	0,029	8,79	8,44	1,85	9,85	<b>7,54 *</b>	0,009
miR-378a-5p	1,25	1,86	1,93	1,82	<b>1,72</b>	0,009	4,62	3,33	2,66	4,90	<b>3,78 *</b>	0,000
miR-379-3p	5,10	2,27	7,44	9,21	<b>5,56 *</b>	0,003	3,02	2,49	3,10	3,13	<b>2,94</b>	0,060
miR-381-3p	1,14	12,19	4,40	6,98	<b>5,18 *</b>	0,032	8,28	3,45	3,60	6,52	<b>5,29 *</b>	0,001
miR-382-3p	1,90	3,93	1,32	2,62	<b>3,05</b>	0,106	1,83	1,51	1,87	5,27	<b>2,37 *</b>	0,038
miR-382-5p	2,98	1,92	3,55	8,43	<b>4,25 *</b>	0,020	1,18	0,98	10,11	4,37	<b>3,52</b>	0,195
miR-384-3p	3,80	2,47	2,78	2,53	<b>3,40 *</b>	0,018	3,02	2,49	3,10	3,13	<b>2,94</b>	0,070
miR-384-5p	2,79	2,98	3,70	5,07	<b>4,70 *</b>	0,020	5,53	2,49	3,10	3,13	<b>3,42</b>	0,076
miR-409a-3p	3,45	11,83	0,99	118,56	<b>8,44</b>	0,293	4,24	2,07	2,09	7,79	<b>3,66 *</b>	0,013
miR-410-3p	2,14	4,95	3,44	1,84	<b>2,96 *</b>	0,007	10,40	5,68	3,32	2,50	<b>5,01 *</b>	0,005
miR-411-5p	7,52	6,63	7,51	29,67	<b>11,98 *</b>	0,003	2,80	2,45	2,98	2,83	<b>2,92 *</b>	0,001
miR-421-5p	1,88	3,33	2,24	2,84	<b>3,05 *</b>	0,027	6,37	1,43	8,86	1,80	<b>4,35</b>	0,100
miR-423-3p	2,26	2,30	2,59	2,29	<b>2,40 *</b>	0,000	3,80	2,39	2,56	3,88	<b>3,13 *</b>	0,000
miR-425-5p	2,80	3,07	2,71	2,76	<b>2,86 *</b>	0,000	10,03	3,57	3,69	8,33	<b>5,93 *</b>	0,001
miR-429-3p	3,45	2,67	1,95	2,55	<b>2,71 *</b>	0,003	7,69	8,54	5,95	8,47	<b>8,39 *</b>	0,000
miR-431-5p	1,05	21,35	6,41	22,11	<b>8,23 *</b>	0,032	8,22	0,98	2,24	5,28	<b>3,35</b>	0,100
miR-433-3p	1,75	5,38	1,85	7,92	<b>4,58 *</b>	0,033	2,46	1,04	1,44	1,67	<b>2,09</b>	0,287
miR-448	2,01	1,39	3,06	3,38	<b>2,54 *</b>	0,024	9,43	2,49	3,10	3,13	<b>3,91</b>	0,074
miR-449a	14,19	1,60	3,59	2,19	<b>4,65</b>	0,191	29,14	2,38	15,00	20,90	<b>17,17 *</b>	0,010
miR-450a-5p	1,16	1,96	1,41	1,22	<b>1,44</b>	0,094	2,47	3,67	3,84	2,59	<b>3,80 *</b>	0,017
miR-455-5p	2,50	1,98	2,35	2,03	<b>2,23 *</b>	0,000	14,56	1,77	2,26	3,48	<b>3,83 *</b>	0,032
miR-463-3p	2,99	7,07	3,22	3,45	<b>4,45 *</b>	0,008	18,61	8,52	3,10	3,13	<b>6,30</b>	0,091
miR-465-5p	1,86	11,07	3,19	18,95	<b>7,58 *</b>	0,023	2,34	0,96	4,01	3,26	<b>2,47</b>	0,055
miR-466b-5p	2,49	3,79	3,11	1,59	<b>2,72 *</b>	0,007	9,07	6,47	5,25	7,49	<b>7,12 *</b>	0,000
miR-466c-5p	2,45	0,54	2,86	1,69	<b>1,79</b>	0,179	14,69	2,84	2,03	3,71	<b>4,57 *</b>	0,022
miR-484	3,61	2,92	2,33	6,63	<b>3,63 *</b>	0,002	5,85	2,68	1,57	3,46	<b>3,13 *</b>	0,010
miR-487b-3p	1,19	41,60	1,28	0,48	<b>5,65</b>	0,358	6,58	3,58	7,22	30,72	<b>10,46 *</b>	0,008
miR-489-3p	1,34	2,32	1,57	1,59	<b>1,68</b>	0,019	7,09	1,81	2,87	3,33	<b>4,05 *</b>	0,026
miR-497a-5p	4,68	2,93	2,61	2,71	<b>4,09 *</b>	0,025	26,13	6,69	7,96	6,89	<b>11,26 *</b>	0,001
miR-499a-3p	3,05	2,10	3,67	2,33	<b>2,80 *</b>	0,002	3,22	2,46	1,03	2,54	<b>2,50</b>	0,054
miR-499a-5p	2,36	3,58	4,49	3,10	<b>3,59 *</b>	0,004	14,04	1,94	2,15	2,80	<b>3,75 *</b>	0,037
miR-500-3p	2,32	2,30	2,40	4,02	<b>2,73 *</b>	0,001	6,92	5,15	1,44	6,42	<b>5,14 *</b>	0,019
miR-501-5p	4,19	4,67	5,09	1,43	<b>3,60 *</b>	0,009	7,32	1,03	4,80	1,20	<b>3,03</b>	0,146
miR-503-5p	0,90	1,19	2,23	3,45	<b>1,78</b>	0,171	9,99	2,57	2,01	3,66	<b>3,87 *</b>	0,014
miR-504	2,61	4,66	2,45	2,92	<b>3,09 *</b>	0,001	11,79	2,40	5,87	20,31	<b>7,92 *</b>	0,005
miR-505-3p	1,82	3,07	1,94	10,08	<b>3,30 *</b>	0,028	2,36	2,56	7,52	2,41	<b>3,88 *</b>	0,021
miR-511-5p	1,65	4,92	5,80	6,18	<b>4,68 *</b>	0,009	1,31	2,85	2,95	2,99	<b>2,63 *</b>	0,022
miR-532-3p	3,23	3,35	2,13	2,41	<b>2,77 *</b>	0,001	6,52	6,37	23,55	9,48	<b>10,16 *</b>	0,001
miR-532-5p	2,59	2,71	2,21	2,36	<b>2,50 *</b>	0,000	7,46	6,32	1,36	1,90	<b>7,89</b>	0,105
miR-540-3p	1,97	6,17	2,20	1,56	<b>2,73</b>	0,036	4,67	2,21	2,74	3,33	<b>3,39 *</b>	0,005
miR-542-3p	1,12	5,90	2,36	4,81	<b>3,08 *</b>	0,061	4,12	3,37	4,43	6,32	<b>5,20 *</b>	0,003
miR-542-5p	3,08	1,35	2,13	1,65	<b>1,97</b>	0,054	3,37	1,98	3,68	2,85	<b>3,47 *</b>	0,021
miR-543-3p	5,19	14,36	11,97	4,89	<b>9,76 *</b>	0,002	12,70	6,55	8,85	3,13	<b>6,97</b>	0,055
miR-582-5p	3,02	5,19	3,44	3,22	<b>3,67 *</b>	0,000	3,99	11,34	4,06	7,65	<b>7,21 *</b>	0,003

miR-598-3p	2,73	3,63	2,67	1,74	<b>2,68 *</b>	0,003	1,57	1,18	1,29	4,00	<b>2,45</b>	0,235
miR-615-5p	6,67	6,98	2,07	8,91	<b>5,98 *</b>	0,005	4,83	1,68	2,00	6,31	<b>3,41 *</b>	0,020
miR-632	0,94	3,95	1,40	25,10	<b>3,68</b>	0,282	6,55	3,30	4,52	1,36	<b>3,44 *</b>	0,012
miR-652-3p	2,60	2,28	2,48	2,23	<b>2,49 *</b>	0,001	6,86	4,14	2,91	5,05	<b>4,55 *</b>	0,000
miR-653-5p	2,61	1,69	2,10	2,26	<b>2,17 *</b>	0,001	7,30	1,74	6,33	8,95	<b>5,80 *</b>	0,008
miR-665	4,43	139,31	6,96	17,23	<b>22,04 *</b>	0,013	1,75	1,93	2,41	2,28	<b>2,17 *</b>	0,007
miR-667-3p	7,91	21,98	8,71	23,98	<b>14,58 *</b>	0,000	6,41	2,85	3,16	5,82	<b>4,65 *</b>	0,002
miR-671-3p	3,54	1,86	1,91	2,20	<b>2,42 *</b>	0,011	1,15	1,29	8,51	3,75	<b>2,90</b>	0,173
miR-672-5p	4,72	2,77	2,24	1,83	<b>2,80 *</b>	0,007	18,27	9,30	19,18	16,87	<b>16,97 *</b>	0,000
miR-674-3p	2,31	6,51	1,69	1,56	<b>2,57 *</b>	0,035	2,73	2,26	3,48	2,89	<b>3,25 *</b>	0,016
miR-674-5p	2,72	3,90	4,18	2,67	<b>3,79 *</b>	0,007	1,46	4,79	5,38	1,86	<b>3,49 *</b>	0,044
miR-708-5p	2,58	2,47	2,12	1,51	<b>2,13 *</b>	0,001	1,54	1,40	1,90	2,18	<b>1,79</b>	0,018
miR-742-3p	2,39	1,95	1,92	3,21	<b>3,19</b>	0,067	9,84	4,24	5,94	15,33	<b>8,98 *</b>	0,001
miR-742-5p	2,36	2,28	1,08	2,18	<b>2,34</b>	0,076	18,28	10,34	10,67	41,99	<b>17,17 *</b>	0,000
miR-743a-3p	2,53	1,73	1,51	2,01	<b>2,54</b>	0,054	14,65	4,91	4,50	9,40	<b>14,62 *</b>	0,010
miR-743b-3p	1,15	1,04	0,67	1,12	<b>1,28</b>	0,985	9,11	2,61	5,21	8,58	<b>6,95 *</b>	0,007
miR-758-3p	2,25	2,38	2,83	2,26	<b>2,89 *</b>	0,036	6,73	3,03	6,66	7,85	<b>5,98 *</b>	0,001
miR-7-5p	3,06	3,17	1,65	3,89	<b>2,87 *</b>	0,003	4,15	2,23	3,17	4,16	<b>3,56 *</b>	0,003
miR-760	3,13	40,72	3,42	2,40	<b>7,31 *</b>	0,045	4,00	3,89	10,40	6,06	<b>5,65 *</b>	0,000
miR-760-5p	7,90	5,60	3,39	2,56	<b>5,09 *</b>	0,006	3,02	2,49	3,10	13,45	<b>4,24</b>	0,139
miR-761	2,70	13,90	18,79	658,07	<b>28,91 *</b>	0,029	6,06	2,96	3,61	4,70	<b>4,29 *</b>	0,000
miR-7a-1-3p	3,90	4,24	2,47	3,01	<b>3,35 *</b>	0,000	3,19	1,80	2,05	3,94	<b>2,69 *</b>	0,005
miR-872-3p	2,39	2,11	2,09	1,63	<b>2,09 *</b>	0,003	1,72	2,58	1,65	4,35	<b>2,96 *</b>	0,042
miR-872-5p	3,62	2,48	2,02	2,38	<b>2,59 *</b>	0,001	4,17	2,17	7,22	3,12	<b>4,13 *</b>	0,007
miR-874-3p	4,46	19,10	5,25	41,47	<b>11,83 *</b>	0,004	8,72	3,95	5,38	6,33	<b>6,01 *</b>	0,000
miR-876	2,19	10,42	9,90	5,42	<b>6,00 *</b>	0,003	3,02	5,64	3,10	3,13	<b>3,61</b>	0,075
miR-877-5p	2,46	2,53	2,15	2,18	<b>2,57 *</b>	0,009	4,32	6,25	2,26	5,86	<b>5,50 *</b>	0,016
miR-878	6,05	2,03	1,32	2,90	<b>2,85 *</b>	0,041	3,59	3,10	4,38	2,54	<b>6,29 *</b>	0,023
miR-883b-3p	2,75	1,48	1,25	1,58	<b>1,98</b>	0,130	1,34	3,41	6,08	3,98	<b>3,87 *</b>	0,028
miR-92a-3p	2,19	2,35	1,88	1,93	<b>2,20 *</b>	0,007	4,84	3,69	4,04	5,55	<b>4,49 *</b>	0,000
miR-92b-3p	5,09	2,31	7,87	1,34	<b>3,74 *</b>	0,033	8,76	2,91	18,84	5,06	<b>8,44 *</b>	0,007
miR-93-5p	2,23	2,29	2,46	1,98	<b>2,31 *</b>	0,001	8,12	8,19	5,79	9,46	<b>7,93 *</b>	0,000
miR-9-3p	6,31	1,55	3,14	3,49	<b>3,94 *</b>	0,027	3,00	10,40	4,99	3,43	<b>4,93 *</b>	0,002
miR-9-5p	4,73	4,97	2,24	4,90	<b>4,46 *</b>	0,004	11,45	5,36	5,78	12,09	<b>8,46 *</b>	0,000
miR-96-5p	1,81	2,01	1,53	2,21	<b>1,89</b>	0,002	9,42	13,18	5,21	11,64	<b>11,11 *</b>	0,001
miR-98-5p	2,66	3,22	2,73	3,79	<b>3,23 *</b>	0,001	21,29	9,61	8,67	12,53	<b>13,86 *</b>	0,000
miR-99a-3p	3,42	1,90	2,36	1,84	<b>2,36 *</b>	0,004	9,35	2,49	3,10	3,13	<b>3,90</b>	0,073
miR-99a-5p	3,83	3,28	2,76	3,02	<b>3,23 *</b>	0,000	8,03	6,71	3,49	9,12	<b>6,50 *</b>	0,000
miR-99b-3p	2,93	2,60	3,11	2,70	<b>2,91 *</b>	0,000	5,48	5,13	2,67	2,33	<b>3,93 *</b>	0,005
miR-99b-5p	2,46	2,30	2,58	1,96	<b>2,38 *</b>	0,001	4,11	3,96	3,17	3,95	<b>3,88 *</b>	0,000

**ANHANG-TABELLE 32: ERGEBNISSE DES MIRNA-PROFILING IN 26 UND 22 WOCHEN ALTEN, FETTLLEIBIGEN ZSF1-RATTEN VERGlichen ZU 14 WOCHEN ALTEN, FETTLLEIBIGEN ZSF1-RATTEN**

Signifikant veränderter miRNAs im Urin und Urin-EVs fettleibiger ZSF1-Ratten im Alter von 14, 22 und 26 Wochen (n=4). Statistische Analyse erfolgte mittels eines zweifachen ANOVA einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zu Woche 14. MiRNAs sind als relative Mittelwerte in fettleibigen ZSF1-Tieren im Alter von 22 und 26 Wochen relativ zum Mittelwert 14 Wochen alter, fettleibiger ZSF1-Tiere dargestellt. Statistische Signifikanz ist als ANOVA \*  $p \leq 0,05$  dargestellt. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta Ct$ -Methode einschließlich Kreatinin-Normalisierung ausgewertet. EV: Extrazelluläre Vesikel. FDR: engl. *False discovery rate*. miR: microRNA.

	EV											
	Fettleibige ZSF1 (Woche 22 vs 14)						Fettleibige ZSF1 (Woche 26 vs 14)					
	#1	#2	#3	#4	MW	P-Wert	#1	#2	#3	#4	MW	P-Wert
let-7b-5p	1,67	1,60	0,99	1,38	<b>1,40</b>	<b>0,071</b>	1,59	1,98	1,70	1,82	<b>1,79</b>	<b>0,267</b>
let-7f-5p	1,63	2,01	1,35	1,42	<b>1,62</b>	<b>0,021</b>	1,68	2,06	1,71	1,69	<b>1,82</b>	<b>0,128</b>
miR-10b-5p	1,52	2,16	1,12	1,59	<b>1,62</b>	<b>0,063</b>	1,52	3,05	1,98	1,84	<b>2,11 *</b>	<b>0,015</b>
miR-16-5p	1,92	1,54	1,39	1,86	<b>1,68</b>	<b>0,004</b>	1,53	1,94	1,68	2,61	<b>1,92</b>	<b>0,208</b>

miR-17-5p	1,54	1,86	1,35	1,53	<b>1,58</b>	<b>0,005</b>	1,30	2,29	1,93	1,98	<b>1,85</b>	<b>0,115</b>
miR-19a-3p	1,43	1,72	1,22	1,29	<b>1,40</b>	<b>0,011</b>	1,35	2,14	1,80	2,61	<b>1,92</b>	<b>0,122</b>
miR-19b-3p	1,92	1,74	1,39	1,37	<b>1,59</b>	<b>0,002</b>	1,49	2,24	2,07	2,56	<b>2,06 *</b>	<b>0,001</b>
miR-20a-5p	1,49	1,62	1,29	1,47	<b>1,47</b>	<b>0,002</b>	1,33	1,91	1,72	1,78	<b>1,68</b>	<b>0,078</b>
miR-23a-3p	1,30	1,40	1,17	1,30	<b>1,30</b>	<b>0,007</b>	1,05	1,52	1,26	1,94	<b>1,41</b>	<b>0,225</b>
miR-25-3p	2,00	2,26	1,12	1,62	<b>1,70</b>	<b>0,025</b>	1,53	2,29	1,88	2,24	<b>1,97</b>	<b>0,285</b>
miR-26b-5p	1,22	2,21	1,06	1,62	<b>1,50</b>	<b>0,110</b>	1,41	1,96	1,79	1,78	<b>1,76</b>	<b>0,098</b>
miR-31-5p	1,18	1,12	0,80	0,93	<b>1,03</b>	<b>0,964</b>	1,55	1,72	1,18	1,65	<b>1,57</b>	<b>0,823</b>
miR-34b-3p	7,11	0,84	1,29	0,70	<b>1,93</b>	<b>0,355</b>	5,74	1,37	1,83	5,47	<b>3,77</b>	<b>0,048</b>
miR-92a-3p	1,57	1,69	1,35	1,38	<b>1,50</b>	<b>0,002</b>	1,41	1,93	1,87	2,03	<b>1,80</b>	<b>0,104</b>
miR-93-5p	1,26	1,29	1,39	1,11	<b>1,27</b>	<b>0,032</b>	1,14	1,58	1,40	1,15	<b>1,32</b>	<b>0,229</b>
miR-125a-5p	1,51	1,41	1,28	1,56	<b>1,44</b>	<b>0,001</b>	1,04	1,51	1,34	1,07	<b>1,23</b>	<b>0,274</b>
miR-125b-5p	1,78	1,79	1,26	1,58	<b>1,60</b>	<b>0,005</b>	1,76	2,16	1,66	1,81	<b>1,85</b>	<b>0,127</b>
miR-139-5p	4,11	1,41	1,59	1,52	<b>2,00 *</b>	<b>0,056</b>	0,26	0,74	0,92	0,83	<b>0,64</b>	<b>0,218</b>
miR-154-3p	1,06	1,16	1,19	0,84	<b>1,07</b>	<b>0,618</b>	1,05	0,86	1,07	3,47	<b>1,38</b>	<b>0,708</b>
miR-184	2,40	3,39	2,24	1,41	<b>2,45</b>	<b>0,025</b>	3,16	4,26	3,46	1,71	<b>3,25</b>	<b>0,009</b>
miR-191-5p	1,81	1,95	1,41	1,61	<b>1,69</b>	<b>0,001</b>	1,83	2,38	1,96	2,11	<b>2,07*</b>	<b>0,000</b>
miR-205-5p	1,53	1,45	1,16	1,40	<b>1,39</b>	<b>0,012</b>	1,35	1,64	1,48	9,07	<b>2,35</b>	<b>0,189</b>
miR-218-5p	1,88	2,09	2,01	1,59	<b>1,90</b>	<b>0,000</b>	1,28	1,87	1,78	1,20	<b>1,52</b>	<b>0,132</b>
miR-219a-2-3p	2,66	3,44	2,66	3,21	<b>3,28 *</b>	<b>0,004</b>	2,32	3,94	5,53	2,63	<b>3,74 *</b>	<b>0,006</b>
miR-323a-5p	6,90	6,42	1,86	2,11	<b>3,68 *</b>	<b>0,012</b>	4,14	3,26	3,15	5,22	<b>3,91 *</b>	<b>0,000</b>
miR-342-3p	2,39	2,28	2,06	2,16	<b>2,28 *</b>	<b>0,001</b>	1,51	2,35	2,76	2,50	<b>2,29 *</b>	<b>0,005</b>
miR-362-3p	0,83	1,63	1,71	1,17	<b>1,35</b>	<b>0,260</b>	1,49	1,95	2,38	1,46	<b>1,87</b>	<b>0,055</b>
miR-374b-5p	2,52	2,07	1,36	1,87	<b>1,93</b>	<b>0,005</b>	1,95	2,12	2,45	2,66	<b>2,30 *</b>	<b>0,000</b>
miR-384-5p	2,12	2,26	2,81	3,86	<b>3,13 *</b>	<b>0,015</b>	2,18	3,88	4,59	4,56	<b>4,25 *</b>	<b>0,007</b>
miR-450a-5p	1,06	1,79	1,29	1,11	<b>1,28</b>	<b>0,113</b>	1,13	1,43	1,80	1,11	<b>1,34</b>	<b>0,101</b>
miR-497a-5p	1,68	1,05	0,94	0,97	<b>1,29</b>	<b>0,668</b>	1,01	1,01	2,05	1,94	<b>1,62</b>	<b>0,873</b>
miR-503-5p	0,52	0,69	1,29	2,00	<b>1,11</b>	<b>0,788</b>	1,18	1,67	1,54	2,83	<b>1,93</b>	<b>0,505</b>
miR-672-5p	2,51	1,48	1,19	0,97	<b>1,52</b>	<b>0,214</b>	1,58	1,73	1,81	2,16	<b>1,91</b>	<b>0,994</b>
miR-742-5p	0,59	0,57	0,27	0,55	<b>0,48 *</b>	<b>0,014</b>	0,61	0,55	0,62	0,62	<b>0,61</b>	<b>0,004</b>
miR-743a-3p	0,55	0,38	0,33	0,44	<b>0,44 *</b>	<b>0,007</b>	0,52	0,59	0,52	0,48	<b>0,55</b>	<b>0,016</b>
miR-743b-3p	0,54	0,49	0,32	0,53	<b>0,49 *</b>	<b>0,017</b>	0,54	0,74	0,85	0,92	<b>0,78</b>	<b>0,305</b>
miR-878	2,18	0,73	0,48	1,04	<b>1,25</b>	<b>0,863</b>	1,22	0,77	1,16	2,84	<b>1,76</b>	<b>0,333</b>
miR-883b-3p	0,58	0,31	0,26	0,33	<b>0,36 *</b>	<b>0,002</b>	0,45	0,64	0,59	0,47	<b>0,54</b>	<b>0,003</b>

**Gesamturin**

**Fettleibige ZSF1 (Woche 26 vs 14)**

	#1	#2	#3	#4	MW	P-Wert
let-7b-5p	2,42	1,84	1,78	2,77	<b>2,26 *</b>	<b>0,007</b>
let-7f-5p	3,37	1,97	2,28	3,28	<b>2,85 *</b>	<b>0,006</b>
miR-10b-5p	2,29	2,01	0,82	1,67	<b>1,69</b>	<b>0,110</b>
miR-16-5p	3,00	1,83	2,17	3,31	<b>2,62 *</b>	<b>0,005</b>
miR-17-5p	2,18	2,11	1,65	2,98	<b>2,22 *</b>	<b>0,003</b>
miR-19a-3p	8,47	2,81	2,96	5,73	<b>5,14 *</b>	<b>0,007</b>
miR-19b-3p	6,41	2,18	3,27	4,92	<b>4,01 *</b>	<b>0,003</b>
miR-20a-5p	3,57	2,72	1,72	3,14	<b>2,80 *</b>	<b>0,004</b>
miR-23a-3p	3,23	2,48	2,06	2,16	<b>2,54 *</b>	<b>0,002</b>
miR-25-3p	2,62	1,92	1,63	2,49	<b>2,19*</b>	<b>0,005</b>
miR-26b-5p	2,15	2,19	1,58	2,59	<b>2,20 *</b>	<b>0,008</b>
miR-31-5p	3,64	2,90	2,76	2,57	<b>3,28 *</b>	<b>0,005</b>
miR-34b-3p	60,62	4,26	14,85	31,50	<b>23,86 *</b>	<b>0,004</b>
miR-92a-3p	2,32	1,77	1,93	2,66	<b>2,20 *</b>	<b>0,003</b>
miR-93-5p	2,10	2,12	1,50	2,45	<b>2,05 *</b>	<b>0,003</b>
miR-125a-5p	2,91	2,39	2,37	2,64	<b>2,59 *</b>	<b>0,000</b>
miR-125b-5p	4,44	3,53	2,49	3,80	<b>3,58 *</b>	<b>0,000</b>
miR-139-5p	0,78	0,34	0,25	0,93	<b>0,52</b>	<b>0,145</b>
miR-154-3p	0,46	0,38	0,47	0,48	<b>2,16 *</b>	<b>0,004</b>
miR-184	5,24	5,57	6,11	2,26	<b>4,62 *</b>	<b>0,001</b>
miR-191-5p	2,23	2,13	1,38	1,89	<b>1,90</b>	<b>0,005</b>
miR-205-5p	2,68	1,71	2,57	2,22	<b>2,42 *</b>	<b>0,009</b>
miR-218-5p	2,43	2,96	1,64	3,98	<b>2,71 *</b>	<b>0,006</b>
miR-219a-2-3p	1,34	1,02	0,72	1,34	<b>1,09</b>	<b>0,588</b>
miR-323a-5p	0,55	0,46	0,57	0,57	<b>0,65</b>	<b>0,248</b>
miR-342-3p	2,25	2,49	2,20	2,00	<b>2,26 *</b>	<b>0,000</b>
miR-362-3p	9,03	7,20	4,41	3,08	<b>5,52 *</b>	<b>0,001</b>
miR-374b-5p	1,77	1,40	1,08	1,88	<b>1,56</b>	<b>0,072</b>
miR-384-5p	1,37	0,62	0,77	0,77	<b>0,94</b>	<b>0,742</b>
miR-450a-5p	2,70	4,01	4,19	2,83	<b>3,84 *</b>	<b>0,007</b>



miR-497a-5p	12,92	3,31	3,93	3,41	<b>5,09 *</b>	<b>0,004</b>
miR-503-5p	14,21	3,65	2,86	5,21	<b>5,35 *</b>	<b>0,004</b>
miR-672-5p	4,15	2,11	4,36	3,83	<b>3,86 *</b>	<b>0,006</b>
miR-742-5p	1,40	0,79	0,82	3,21	<b>1,39</b>	<b>0,400</b>
miR-743a-3p	1,12	0,38	0,35	0,72	<b>0,63</b>	<b>0,318</b>
miR-743b-3p	0,66	0,19	0,38	0,62	<b>0,61</b>	<b>0,299</b>
miR-878	4,12	3,56	5,03	2,92	<b>3,89 *</b>	<b>0,000</b>
miR-883b-3p	0,31	0,78	1,39	0,91	<b>0,77</b>	<b>0,604</b>

### ANHANG-TABELLE 33: ROHDATEN DER ZWEITEN MIRNA-QUANTIFIZIERUNG MIT AUSGEWÄHLTEN ASSAYS IM URIN VON ZSF1-RATTEN

Rohwerte ausgewählter miRNAs in Urin nach EV-Anreicherung und Gesamturin fettleibiger und schlanker ZSF1-Ratten (n=4) zur Bestätigung des ersten Profilings. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (Qiagen) quantifiziert. Es sind Ct-Werte gezeigt. EV: Extrazelluläre Vesikel. W: Woche. miR: microRNA.

	EV						Gesamturin					
	Fettleibig			Schlank			Fettleibig			Schlank		
	W14	W22	W26	W14	W22	W26	W14	W22	W26	W14	W22	W26
miR-23a-3p	25,51	25,32	25,10	26,39	25,01	25,23	27,73	26,78	26,12	28,17	27,11	27,32
	25,49	25,29	24,93	25,91	25,41	24,90	27,42	26,55	26,27	27,03	27,72	27,27
	25,84	25,63	25,30	25,37	25,17	24,90	28,01	26,28	26,59	26,91	27,12	26,82
	25,81	24,82	25,28	25,41	25,02	24,50	27,98	25,50	26,33	27,26	27,25	26,75
miR-125b-5p	27,64	26,92	26,68	28,70	27,45	27,63	29,31	27,98	27,25	30,39	29,58	29,67
	27,51	27,05	26,46	28,11	27,55	26,95	29,47	27,99	27,24	29,29	29,69	29,16
	27,8	27,47	26,98	27,55	27,39	27,34	30,00	27,47	27,69	29,21	29,15	28,73
	27,88	26,52	26,80	28,01	27,41	26,97	29,94	26,92	27,37	29,95	29,35	28,49
miR-10a-5p	28,84	28,48	28,40	32,59	30,79	31,39	31,95	31,92	30,86	35,35	33,65	32,96
	28,58	28,66	28,25	32,05	31,13	30,84	32,15	31,77	31,56	34,00	34,40	32,57
	29,21	29,31	28,62	31,33	31,11	31,09	32,91	31,50	31,90	34,20	32,35	31,53
	29,54	28,33	28,70	32,23	31,21	30,68	32,89	30,78	31,25	35,07	32,53	32,54
miR-212-3p	31,83	32,12	32,02	32,43	32,45	32,57	30,92	31,18	30,96	30,28	31,16	31,76
	31,68	31,52	31,93	32,36	32,31	32,11	30,89	30,97	31,28	30,30	31,27	32,39
	31,96	32,07	32,29	32,13	32,13	31,71	30,96	31,35	32,10	30,96	32,15	31,57
	32,18	32,42	32,52	32,44	32,26	32,37	31,34	30,72	31,28	30,18	32,16	31,56
miR-15b-5p	27,46	27,19	26,98	29,67		28,14	30,65	29,53	28,57	32,42	28,97	31,57
	27,44	27,23	26,68	28,6	27,67	27,30	30,26	29,97	29,91	30,14	30,99	30,45
	28,11	27,92	27,09	28,10	27,65	28,12	30,73	29,65	29,97	30,06	30,96	30,96
	27,78	26,80	26,97	29,48	27,82	27,51	30,95	29,16	28,89	31,99	31,02	30,93
miR-191-5p	25,67	24,80	24,79	27,79	25,02	25,69	27,69	27,01	26,66	29,76	26,90	27,53
	25,13	25,02	24,64	27,19	25,68	25,43	27,13	27,23	26,68	28,40	27,93	27,52
	26,08	25,40	24,90	26,57	25,49	25,55	28,25	27,24	27,05	28,04	27,31	27,03
	26,02	24,66	25,19	27,01	25,53	25,02	28,24	26,39	26,84	28,54	27,46	27,08
cel-miR-39-3p	17,81	17,61	17,58	18,49	18,04	17,65	17,98	17,91	17,86	17,84	18,38	18,17
	17,53	17,41	17,57	18,60	17,93	17,86	18,13	17,67	18,47	18,08	18,85	18,16
	17,87	17,67	17,43	18,51	18,20	17,59	17,49	17,65	18,84	18,49	18,44	17,97
	17,45	17,64	17,78	18,14	17,85	17,57	17,59	17,46	17,86	18,50	18,07	18,26

**ANHANG-TABELLE 34: ERGEBNISSE DER ZWEITEN MIRNA-QUANTIFIZIERUNG AUSGEWÄHLTER MIRNAS IM URIN VON ZSF1-RATTEN**

Ergebnisse der Bestätigung ausgewählter miRNAs in Urin nach EV-Anreicherung und Gesamturin fettleibiger und schlanker ZSF1-Ratten (n=4). Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifachem ANOVA einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur gleichaltrigen Kontrolle und über die Zeit. Es sind Mittelwerte fettleibiger ZSF1-Ratten verglichen zur gleichaltrigen, schlanken Kontrolle gezeigt. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta Ct$ -Methode einschließlich Kreatinin-Normalisierung ausgewertet. EV: Extrazelluläre Vesikel. W: Woche. OvL: Fettleibig relativ zu schlank. FDR: engl. *False discovery rate*. miR: microRNA.

Experiment	Profiling (Woche 26 vs 14)		Zweite Messung: EV OvL			Zweite Messung: Gesamturin OvL		
	EV W22	Gesamturin W26	W14	Wk22	W26	W14	W22	W26
miR-23a-3p	/	2,54	2,75	2,35	2,44	2,25	5,15	4,81
miR-125b-5p	/	3,58	3,32	3,48	4,14	3,13	9,14	9,07
miR-191-5p	2,07	/	6,79	3,49	4,28	5,56	3,41	4,12
miR-10a-5p	2,57	/	20,46	13,00	16,75	13,87	8,48	5,91
miR-15b-5p	2,13	2,76	6,12	3,26	5,26	4,34	4,75	9,22
miR-212-3p	2,74	/	3,43	3,02	2,94	2,02	3,92	3,94

**ANHANG-TABELLE 35: ROHDATEN DER MIRNA-QUANTIFIZIERUNG IM NIERENGEWEBE VON ZSF1-RATTEN MITTELS qRT-PCR**

Quantifizierung von miRNAs im Nierengewebe von 14 und 26 Wochen alten, fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten mittels individueller qRT-PCR Assays von Qiagen (15 ausgewählte miRNAs, Woche 14: n= 4; Woche 26: n=8). Es sind Ct-Werte gezeigt. miR: microRNA. W: Woche.

	Fettleibig ZSF1						Schlank ZSF1			
	W14		W26				W14		W26	
miR-23a-3p	18,65	18,61	19,45	19,54	19,44	19,23	19,72	19,76	19,65	19,60
	18,67	19,87	19,41	19,60	19,01	18,97	19,93	19,13	19,46	19,75
miR-125b-5p	18,99	19,84	20,49	20,61	20,34	20,12	20,44	20,72	20,33	20,39
	20,21	21,05	20,35	20,79	20,20	20,64	20,90	20,30	20,20	20,46
miR-10a-5p	23,54	24,38	25,81	25,64	26,12	25,29	25,81	26,76	26,43	26,22
	24,50	26,27	25,87	26,54	25,22	25,46	26,97	25,66	25,70	26,37
miR-15b-5p	23,06	24,73	25,68	25,88	25,88	25,39	26,16	26,58	25,89	26,53
	25,08	26,22	25,95	26,15	25,37	25,87	26,70	26,05	26,04	26,54
miR-191-5p	20,10	19,86	20,79	20,98	20,88	20,69	21,01	21,15	20,98	20,95
	19,90	21,16	20,88	20,93	20,41	20,35	21,20	20,54	20,85	21,01
miR-21-5p	17,93	18,40	18,97	19,37	18,90	18,65	20,13	20,33	20,15	20,24
	18,40	19,98	19,17	19,11	18,51	18,46	20,63	19,74	20,06	20,33
miR-16-5p	18,01	17,71	18,51	18,69	18,71	18,56	18,72	18,72	18,83	18,80
	17,53	18,84	18,60	18,78	18,18	17,96	18,87	18,06	18,76	18,88
miR-192-5p	19,00	18,54	19,63	19,70	19,95	19,78	19,40	19,40	19,38	19,33
	18,48	19,79	19,76	19,93	19,27	19,05	19,65	18,97	19,36	19,49
miR-200b-3p	21,26	20,95	21,99	22,05	22,41	22,26	22,38	22,28	22,16	22,11
	20,95	22,16	22,20	22,41	21,84	21,61	22,33	21,95	22,16	22,34
miR-29c-3p	20,81	22,38	24,01	24,23	24,03	23,87	23,98	24,39	23,90	23,86
	22,63	24,41	24,22	24,65	23,61	23,88	24,46	23,53	23,60	23,76
miR-30d-5p	19,32	19,48	20,64	20,90	20,87	20,79	20,76	20,87	20,63	20,77
	19,70	20,96	20,76	21,10	20,45	20,71	21,01	20,44	20,65	20,81
miR-19b-3p	20,05	21,11	22,61	22,96	22,06	21,95	22,48	22,80	22,47	22,45
	21,50	23,55	22,42	22,98	21,92	22,21	23,08	21,86	22,12	22,59
miR-25-3p	22,37	22,25	23,01	23,20	23,05	22,91	23,09	23,16	23,26	23,16
	22,26	23,45	23,01	23,28	22,63	22,66	23,33	22,65	23,05	23,34
miR-34a-5p	25,71	27,99	29,33	29,86	28,72	28,74	31,32	31,35	30,61	30,97
	28,56	30,45	29,12	29,67	28,80	29,43	31,41	30,51	30,20	31,02
miR-34c-3p	30,10	29,87	30,10	30,67	30,19	29,92	30,41	30,53	30,52	30,53
	30,12	31,22	30,41	30,10	29,74	29,74	30,62	30,18	30,40	30,67
U6	29,42	30,34	30,92	31,23	31,37	30,83	31,65	31,85	31,60	31,67
	30,31	31,56	31,29	31,36	31,06	30,86	31,67	31,18	31,28	31,55

**ANHANG-TABELLE 36: ROHDATEN DER MIRNA-QUANTIFIZIERUNG IM NIERENGEWEBE VON ZSF1-RATTEN MITTELS NANOSTRING**

Quantifizierung von miRNAs im Nierengewebe von 14 und 26 Wochen alten, fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten mittels der Nanostring-Plattform (420 miRNAs; Woche 14: n=5; Woche 26: n=9). Es sind absolute Werte ohne Normalisierung gezeigt. miR: microRNA. W: Woche.

	Fettleibig ZSF1						Schlank ZSF1					
	W14			W26			W14			W26		
miR-21-5p	5635,5 2957,7 2439,0	4328,4 2489,0		2608,3 3596,0 1620,2	3055,0 3726,5		429,3 2022,9 2646,0	4142,5 3951,7		4426,1 5437,5	5375,6 2598,3	
miR-34a-5p	4,8 6,9	4,6 10,1	1,7	1,0 8,7	3,3 1,0	3,3	1,1 1,0	1,0 1,0	1,0	3,2 1,0	1,0	
miR-192-5p	1826,4 1382,9 3872,7	1668,0 1300,9		935,0 1049,7 559,3	1133,8 957,7		550,2 2172,3 2874,1	4645,2 4701,2		4905,4 5828,0	6337,6 2703,9	
miR-29c-3p	8986,4 5373,3 4765,3	6006,6 4139,3		3179,0 3590,9 2719,2	4014,9 3128,3		1803,2 5660,7 7130,1	10726,2 10820,5		10991,9 12318,0	13539,9 7239,5	
miR-184	38,6 36,9	42,3 35,1	42,1	87,7 70,1	59,2 50,0	68,3	1,1 1,3	3,1 1,0	1,04	3,1 1,0	1,7 5,3	
miR-132	85,6 74,8	102,7 74,5	62,3	101,0 124,0	85,7 80,3	128,2	16,87 42,9	45,3 28,5	40,6	39,6 26,0	31,3 46,1	

**ANHANG-TABELLE 37: ROHDATEN DER EV-MIRNA QUANTIFIZIERUNG NACH EV-ANREICHERUNG MITTELS SEC, UND VERGLEICH ZUM GLOMERULONEPHRITIS-RATTENMODELL**

Rohdaten der Quantifizierung ausgewählter miRNAs im Gesamurin und Urin-EVs von fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten (n=4) und von NTS-induzierter Glomerulonephritis in WKY-Ratten (NTS: n=5; Kontrollen n=3). Die gezeigte EV-Isolation in ZSF1-Ratten erfolgte durch qEV-Säulen (Izon), die Isolation im Glomerulonephritis-Rattenmodell erfolgte mit dem miRCURY Exosome Isolation Kit (Qiagen). W: Woche. T: Tag. GN: Glomerulonephritis. EV: Extrazelluläre Vesikel. WKY: Wistar-Kyoto-Ratte. miR: microRNA.

	EV								Gesamurin			
	Fettleibig ZSF1		Schlank ZSF1		Kontrolle WKY		GN		Kontrolle WKY		GN	
	W0	W12	W0	W12	T8	T14	T8	T14	T8	T14	T8	T14
miR-10a-5p	33,06	30,68	34,55	31,26	35,56	35,33	34,46	32,48	33,26 31,25 35,21	34,56 35,47 35,22	33,58 31,40 30,67	33,74 33,59 33,31
miR-23a-3p	26,65	25,70	34,55	31,26	26,59	26,03	25,95	24,09	28,66 27,24 29,23	27,79 27,90 27,86	31,51 29,41 27,73	28,02 27,59 27,19
miR-125b-5p	28,51	26,59	26,17	25,58	28,92	28,47	28,09	26,82	31,39 32,02 32,02	29,42 30,75 30,48	32,48 31,00 30,26	30,65 30,12 29,95
miR-191-5p	27,23	24,90	28,29	27,61	28,67	28,38	27,17	25,71	31,13 29,55 32,41	30,83 30,82 30,71	31,47 30,18 29,25	29,42 29,17 29,05
miR-15b-5p	30,06	28,28	28,00	26,26	31,27	30,67	29,67	28,61	32,94 32,08 34,62	32,74 33,55 33,06	32,61 31,05	32,36 32,29 30,95
miR-16-5p	25,93	23,53	31,51	29,89	27,74	27,28	25,79	24,37	31,11 29,26 32,23	29,88 30,12 30,19	29,45 28,93 28,17	29,45 28,93 28,17
miR-200b-3p	27,01	24,84	27,16	25,29	27,56	27,30	26,07	25,40	29,87 29,17 32,07	29,28 29,98 29,99	31,95 30,20 28,74	30,48 30,52 28,68
miR-29c-3p	28,14	26,21	28,74	28,09	29,67	27,96	27,90	26,50	34,51 30,86 36,08	30,46 32,42 32,32	34,64 32,04 30,16	31,05 30,43 29,34
miR-30d-5p	25,95	24,43	28,75	27,04	26,73	26,11	25,77	24,24	29,66 28,00 31,08	28,71 28,93 28,92	31,10 29,12 28,02	28,45 28,20 27,95
miR-19b-3p	28,47	26,46	26,18	25,19	29,08	28,71	27,34	26,15	33,38 29,36 33,78	31,32 33,46 33,71	34,25 32,30 30,03	32,51 31,95 30,73
miR-25-3p	29,44	27,03	29,35	27,58	30,13	30,06	28,95	27,55	32,38 29,32 33,43	30,73 32,22 32,23	32,61 31,04 30,33	31,68 31,01 30,15

miR-34a-5p	31,53	29,31	30,30	28,53	33,75	31,59	31,45	30,41	37,00	33,28	35,70	33,47
									31,22	34,50	33,69	32,58
									34,76	34,06	32,88	32,30
cel-miR-39-3p	19,26	18,78	33,60	32,05	16,99	16,72	16,97	16,87	/	/	/	/
ath-miR-159a	/	/	/	/	/	/	/	/	21,57	20,87	22,57	21,76
									20,67	21,33	22,10	22,09
									21,27	21,29	20,98	21,26

### ANHANG-TABELLE 38: ERGEBNISSE DER EV-MIRNA QUANTIFIZIERUNG NACH EV-ANREICHERUNG MITTELS SEC, UND VERGLEICH ZUM GLOMERULONEPHRITIS-RATTENMODELL

Vergleich signifikant veränderter miRNAs im Gesamturin von fettleibigen und schlanken ZSF1-Ratten (n=4) mit publizierten miRNA-Daten aus Urin von NTS-induzierter Glomerulonephritis in WKY-Ratten (NTS: n=5; Kontrollen n=3). Die Isolation von Urin-EVs in fettleibiger ZSF1-Ratten erfolgte durch das miRCURY Exosome Isolation Kit (Qiagen, Profiling) oder qEV-Säulen (Izon, SEC) und im Rattenmodells für NTS-induzierte Glomerulonephritis durch das miRCURY Exosome Isolation Kit (Qiagen). Es sind die Verhältnisse der erkrankten Tiere relativ zum Mittelwert der entsprechenden Kontrollen gezeigt. Alle Ergebnisse wurden nach der modifizierten  $\Delta$ Ct-Methode einschließlich Kreatinin-Normalisierung ausgewertet. Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur schlanken Kontrolle. Statistische Signifikanz ist als \* gekennzeichnet. W: Woche. GN: Glomerulonephritis. EV: Extrazelluläre Vesikel. OvL: Fettleibig versus schlanke Kontrolle. SEC: Größenausschlusschromatographie. WKY: Wistar-Kyoto-Ratte. miR: microRNA. NTS: Nephrotoxisches Serum.

miRNA	ZSF1 OvL				NTS-Induzierte GN (WKY Ratten, 0,5 ml/100g KG)			
	Profiling		2, EV Isolationsmethod (SEC)		EV (SEC)		Gesamturin	
	EV (W22)	Gesamturin (W26)	EV (W14)	EV (W26)	(W1)	(W2)	(W1)	(W2)
miR-10a-5p	2,21 ± 0,59*	1,99 ± 0,53	6,34	3,94	4,18	5,43	4,38 ± 1,85*	4,41 ± 0,80*
miR-34a-5p	9,78 ± 2,02*	11,37 ± 4,12*	9,51	17,50	4,82	7,91	1,11 ± 0,45	3,49 ± 1,37*
miR-125b-5p	3,15 ± 0,49*	12,56 ± 2,85*	1,93	5,32	3,91	3,79	3,51 ± 0,86*	1,47 ± 0,37
miR-19b-3p	2,66 ± 0,45*	12,51 ± 5,54*	4,18	5,67	8,65	3,60	1,50 ± 1,49	3,05 ± 2,09
miR-16-5p	3,40 ± 0,51*	11,80 ± 3,18*	5,26	8,91	7,08	5,33	3,69 ± 2,73	3,84 ± 1,86
miR-15b-5p	3,40 ± 1,29*	10,44 ± 5,11*	6,16	8,02	6,34	4,08	4,34 ± 2,72	4,03 ± 2,58
miR-29c-3p	2,55 ± 0,39*	5,94 ± 2,38*	3,46	4,68	7,76	4,44	4,03 ± 3,83	4,14 ± 2,68
miR-191-5p	2,42 ± 0,34*	5,08 ± 1,01*	3,85	6,73	6,61	5,37	3,38 ± 0,98*	4,56 ± 0,67*
miR-25-3p	2,87 ± 0,81*	8,88 ± 1,92*	4,09	7,45	6,67	4,90	1,83 ± 0,47	2,69 ± 1,51
miR-30d-5p	2,36 ± 0,37*	5,38 ± 0,96*	2,65	4,45	4,67	4,70	2,34 ± 1,22	2,45 ± 0,48*
miR-23a-3p	1,88 ± 0,14*	6,37 ± 1,36*	1,63	2,42	4,81	4,96	1,19 ± 0,78	1,88 ± 0,59
miR-200b-3p	3,26 ± 0,92*	10,20 ± 3,46*	7,48	24,90	3,70	2,00	2,38 ± 1,49	1,70 ± 1,39

### ANHANG-TABELLE 39: ROHDATEN DES MIRNA-PROFILING IN mRENTG-RATTEN

Rohdaten der miRNA-Quantifizierung in Urin-EVs von mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME und in der SD-Kontrolle (n=4). MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (Qiagen) quantifiziert. Es sind Ct-Werte gezeigt. EV: Extrazelluläre Vesikel. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. SD: Sprague-Dawley-Ratten. miR: microRNA. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester.

miRNA	mRenTG + L-NAME: EVs								SD Kontrolle - EVs				mRenTG + L-NAME: Gesamturin				
	Woche 0				Woche 8				Woche 8				Woche 8				
miR-295-5p	37,5	37,8	36,5	/	/	/	/	35,3	39,4	39,7	/	/	/	/	/	/	35,5
miR-1188-5p	35,3	39,5	38,3	39,7	36,5	/	/	35,5	37,3	/	/	31,3	/	/	/	/	/
miR-135b-5p	34,2	33,2	34,0	34,3	34,0	35,6	34,2	35,0	32,6	33,2	31,6	32,9	36,5	35,5	35,5	35,5	35,5
miR-135b-3p	39,0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	37,2	/	/	/	/	/













miR-511-5p	35,3	38,7	35,4	/	35,7	37,8	37,5	37,5	36,8	36,6	/	/	36,4	/	35,2	36,3
miR-351-5p	31,2	31,2	31,9	31,4	32,3	32,3	32,5	32,7	31,7	31,9	31,1	30,9	34,6	34,4	35,4	35,3
miR-497a-5p	35,0	34,7	35,2	35,1	35,0	/	35,2	35,5	/	39,0	35,3	/	/	35,5	34,5	35,3
miR-136-5p	38,3	35,4	/	/	34,8	37,0	39,3	/	/	35,0	34,6	/	38,6	/	/	/
cel-miR-39-3p	17,6	17,7	17,9	17,9	17,6	17,7	17,8	17,7	17,8	17,7	17,8	17,8	19,3	19,3	18,8	18,8
UniSp3	20,5	20,5	20,6	20,5	20,4	20,6	20,6	20,5	20,6	20,5	20,6	20,6	20,6	20,7	20,6	20,6
Unisp6	17,0	17,0	17,2	17,0	17,1	17,1	17,3	17,0	17,3	17,1	17,1	17,2	17,2	17,1	16,9	17,0

#### ANHANG-TABELLE 40: ERGEBNISSE DES MIRNA-PROFILING IN MRENTG-RATTEN

Signifikant veränderter miRNAs in Urin-EVs von mRenTG-Ratten nach achtwöchiger Behandlung mit L-NAME verglichen zum Behandlungsstart und verglichen zur SD-Kontrolle (n=4). Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur Kontrolle. Es sind die Verhältnisse der erkrankten Tiere relativ zum Mittelwert der entsprechenden Kontrollen gezeigt. Relative miRNA-Mengen wurden mit relativen Mengen in Urin-EVs von fettleibigen ZSF1-Ratten relativ zur schlanken Kontrolle verglichen. Statistische Analyse der miRNAs in ZSF1-Ratten erfolgte ebenfalls mittels multiplen T-Test einschließlich Korrektur durch die FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 2$  verglichen zur schlanken Kontrolle. Statistische Signifikanz ist mit \* gezeigt. MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Platten (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta Ct$  Methode ausgewertet. W: Woche. EV: Extrazelluläre Vesikel. mRenTG: Maus Renin2-transgene Ratten. SD: Sprague-Dawley-Ratten. OvL: Fettleibig versus schlanke Kontrolle. FDR: engl. *False discovery rate*. miR: microRNA. L-NAME: N( $\omega$ )-nitro-L-Argininmethylester.

miRNA	EV			
	mRenTG + L-NAME: W 8 vs. W0	mRenTG + L-NAME (W 8) vs SD	ZSF1 fettleibig: W26 vs. W14	ZSF1 OvL: W22
miR-130a-3p	0,43 *	0,69	1,35	2,03 *
miR-138-5p	0,23 *	0,35	0,93	0,90
miR-154-3p	0,95	3,93 *	1,38	2,53
miR-20b-3p	0,75	4,56 *	2,22	2,74
miR-301a-3p	0,48 *	0,92	1,64	2,42 *
miR-301a-5p	0,15 *	0,93	2,25 *	3,05 *
miR-351-5p	0,42 *	0,85	1,40	1,16
miR-376c-3p	0,25 *	0,48	1,71	1,38

#### Anhang-Tabelle 41: MIRNA-CLUSTERANALYSE VON 93 AUSGEWÄHLTEN MIRNAS MIT SIGNIFIKANTEN ÄNDERUNGEN IN HRPTECS IN VITRO UND IM URIN VON ZSF1-RATTEN IN VIVO

Signifikant veränderte miRNAs wurden einer miRNA-Clusteranalyse mit der Webapplikation von Li et al (2018) analysiert. Von den 93 miRNAs konnten 87 miRNAs für diese Analyse verwendet werden. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant definiert. EMT: Epitheliale-Mesenchymale Transition. miRNA: microRNA. FDR: engl. *False discovery rate*.

Kategorie	Anzahl miRNAs	P-Wert	Bonferroni	FDR	miRNAs
Funktion					
Entzündung	42	5,49E-20	6,85E-17	2,15E-18	hsa-mir-24-1, hsa-mir-9-1, hsa-mir-124-2, hsa-mir-125b-1, hsa-let-7d, hsa-mir-146b, hsa-mir-7-2, hsa-mir-9-2, hsa-mir-124-3, hsa-mir-155, hsa-mir-132, hsa-mir-7-1, hsa-mir-7-3, hsa-mir-122, hsa-mir-133a-2, hsa-mir-424, hsa-mir-125a, hsa-mir-708, hsa-let-7f-2, hsa-mir-188, hsa-mir-218-2, hsa-mir-98, hsa-mir-146a, hsa-mir-184, hsa-mir-145, hsa-mir-125b-2, hsa-mir-205, hsa-mir-93, hsa-mir-342, hsa-mir-133a-1, hsa-mir-20a, hsa-mir-17, hsa-mir-130b, hsa-mir-31, hsa-mir-34c, hsa-mir-124-1, hsa-mir-25, hsa-mir-24-2, hsa-mir-218-1, hsa-mir-9-3, hsa-mir-19a, hsa-mir-27a
Immunantwort	33	9,20E-15	1,15E-11	1,99E-13	hsa-mir-362, hsa-mir-9-1, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-125b-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-146b, hsa-mir-9-2, hsa-mir-155, hsa-mir-132, hsa-mir-19b-1, hsa-mir-338, hsa-mir-181c, hsa-mir-16-1, hsa-mir-29b-2, hsa-mir-424, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-532, hsa-mir-500a, hsa-mir-98, hsa-mir-19b-2, hsa-mir-146a, hsa-mir-125b-2, hsa-mir-93, hsa-mir-342, hsa-mir-20a, hsa-mir-17, hsa-mir-200b, hsa-mir-31, hsa-mir-34c, hsa-mir-25, hsa-mir-9-3, hsa-mir-19a, hsa-mir-27a
EMT	26	4,39E-10	5,47E-07	5,21E-09	hsa-mir-125a, hsa-let-7a-2, hsa-let-7b, hsa-mir-215, hsa-mir-29c, hsa-let-7c, hsa-mir-124-2, hsa-mir-30d, hsa-mir-26b, hsa-mir-450a-2, hsa-let-7e, hsa-mir-200b, hsa-let-7a-3, hsa-let-7d, hsa-mir-29b-2, hsa-mir-31, hsa-mir-191, hsa-mir-124-1, hsa-mir-450a-1, hsa-mir-184, hsa-mir-145, hsa-mir-424, hsa-mir-124-3, hsa-mir-205, hsa-let-7a-1, hsa-mir-155

<b>Glukosemetabolism</b>	14	7,40E-09	9,23E-06	6,84E-08	hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-let-7c,hsa-mir-20a,hsa-mir-124-2,hsa-let-7e,hsa-mir-23a,hsa-mir-125b-1,hsa-let-7d,hsa-mir-124-1,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-124-3,hsa-let-7a-1,hsa-mir-484 hsa-mir-24-1,hsa-mir-9-1,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-208a,hsa-mir-16-2,hsa-mir-130a,hsa-mir-7-2,hsa-mir-9-2,hsa-mir-497,hsa-mir-155,hsa-mir-132,hsa-mir-7-1,hsa-mir-19b-1,hsa-mir-7-3,hsa-mir-16-1,hsa-mir-29b-2,hsa-mir-10a,hsa-mir-122,hsa-mir-133a-2,hsa-mir-424,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-28,hsa-mir-125a,hsa-mir-34b,hsa-mir-29c,hsa-mir-26b,hsa-mir-218-2,hsa-mir-23a,hsa-mir-98,hsa-mir-19b-2,hsa-mir-146a,hsa-mir-145,hsa-mir-504,hsa-mir-216b,hsa-mir-133a-1,hsa-let-7c,hsa-mir-20a,hsa-mir-17,hsa-mir-15b,hsa-mir-34c,hsa-mir-216a,hsa-mir-24-2,hsa-mir-9-3,hsa-mir-218-1,hsa-mir-19a,hsa-mir-27a
<b>Apoptose</b>	46	1,81E-25	2,25E-22	1,99E-23	hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-24-1,hsa-mir-19b-1,hsa-mir-7-1,hsa-mir-29c,hsa-let-7c,hsa-mir-20a,hsa-mir-7-3,hsa-mir-30d,hsa-let-7f-1,hsa-let-7f-2,hsa-mir-17,hsa-mir-212,hsa-mir-92a-1,hsa-let-7e,hsa-mir-130b,hsa-mir-23a,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-98,hsa-let-7a-3,hsa-let-7d,hsa-mir-16-1,hsa-mir-19b-2,hsa-mir-29b-2,hsa-mir-16-2,hsa-mir-146a,hsa-mir-25,hsa-mir-24-2,hsa-mir-184,hsa-mir-145,hsa-mir-10b,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-7-2,hsa-mir-205,hsa-mir-19a,hsa-let-7a-1,hsa-mir-497,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-155
<b>Zelltod</b>	40	2,35E-25	2,94E-22	2,38E-23	hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-24-1,hsa-mir-19b-1,hsa-mir-34b,hsa-mir-9-1,hsa-mir-20a,hsa-mir-124-2,hsa-mir-503,hsa-mir-17,hsa-mir-15b,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-98,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-200b,hsa-let-7a-3,hsa-mir-16-1,hsa-mir-19b-2,hsa-mir-29b-2,hsa-mir-191,hsa-mir-31,hsa-mir-34c,hsa-mir-124-1,hsa-mir-16-2,hsa-mir-24-2,hsa-mir-145,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-122,hsa-mir-9-3,hsa-mir-424,hsa-mir-9-2,hsa-mir-124-3,hsa-mir-205,hsa-mir-19a,hsa-let-7a-1,hsa-mir-27a,hsa-mir-155,hsa-mir-497,hsa-mir-92a-2
<b>Zellzyklus</b>	39	8,00E-23	9,97E-20	4,61E-21	hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-24-1,hsa-mir-34b,hsa-mir-29c,hsa-let-7c,hsa-mir-9-1,hsa-mir-124-2,hsa-mir-224,hsa-mir-17,hsa-mir-503,hsa-mir-15b,hsa-mir-92a-1,hsa-let-7e,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-200b,hsa-mir-374b,hsa-let-7d,hsa-mir-16-1,hsa-mir-29b-2,hsa-mir-34c,hsa-mir-124-1,hsa-mir-16-2,hsa-mir-146a,hsa-mir-24-2,hsa-mir-130a,hsa-mir-145,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-9-3,hsa-mir-9-2,hsa-mir-124-3,hsa-mir-93,hsa-let-7a-1,hsa-mir-92a-2 hsa-mir-125a,hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-34b,hsa-mir-7-1,hsa-mir-29c,hsa-let-7c,hsa-mir-7-3,hsa-mir-124-2,hsa-let-7f-1,hsa-let-7f-2,hsa-mir-26b,hsa-mir-181c,hsa-let-7e,hsa-mir-98,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-200b,hsa-let-7a-3,hsa-let-7d,hsa-mir-16-1,hsa-mir-34c,hsa-mir-124-1,hsa-mir-16-2,hsa-mir-145,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-122,hsa-mir-7-2,hsa-mir-124-1,hsa-mir-19b-1,hsa-mir-20a,hsa-mir-106b,hsa-mir-224,hsa-mir-17,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-19b-2,hsa-mir-191,hsa-mir-146a,hsa-mir-146b,hsa-mir-214,hsa-mir-24-2,hsa-mir-93,hsa-mir-19a,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-27a,hsa-mir-155
<b>Zellproliferation</b>	34	5,55E-18	6,91E-15	1,77E-16	hsa-mir-125a,hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-34b,hsa-mir-7-1,hsa-mir-29c,hsa-let-7c,hsa-mir-7-3,hsa-mir-124-2,hsa-let-7f-1,hsa-let-7f-2,hsa-mir-26b,hsa-mir-181c,hsa-let-7e,hsa-mir-98,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-200b,hsa-let-7a-3,hsa-let-7d,hsa-mir-16-1,hsa-mir-34c,hsa-mir-124-1,hsa-mir-16-2,hsa-mir-145,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-122,hsa-mir-7-2,hsa-mir-124-1,hsa-mir-19b-1,hsa-mir-20a,hsa-mir-106b,hsa-mir-224,hsa-mir-17,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-19b-2,hsa-mir-191,hsa-mir-146a,hsa-mir-146b,hsa-mir-214,hsa-mir-24-2,hsa-mir-93,hsa-mir-19a,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-27a,hsa-mir-155
<b>Tumorsuppressor MiRNAs</b>	29	5,62E-16	7,01E-13	1,39E-14	hsa-mir-24-1,hsa-mir-9-1,hsa-mir-124-2,hsa-mir-30d,hsa-mir-92a-1,hsa-let-7d,hsa-mir-146b,hsa-mir-7-2,hsa-mir-9-2,hsa-mir-124-3,hsa-mir-376b,hsa-mir-155,hsa-mir-132,hsa-mir-7-1,hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-7-3,hsa-let-7a-3,hsa-mir-29b-2,hsa-mir-122,hsa-mir-133a-2,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-28,hsa-mir-29c,hsa-mir-503,hsa-mir-23a,hsa-mir-98,hsa-mir-146a,hsa-mir-214,hsa-mir-145,hsa-mir-93,hsa-mir-133a-1,hsa-let-7c,hsa-mir-15b,hsa-mir-212,hsa-let-7e,hsa-mir-200b,hsa-mir-191,hsa-mir-124-1,hsa-mir-24-2,hsa-mir-9-3,hsa-let-7a-1,hsa-mir-27a,hsa-mir-130a,hsa-mir-130b
<b>Onco-MiRNAs</b>	18	2,15E-10	2,68E-07	2,74E-09	hsa-mir-24-1,hsa-mir-9-1,hsa-mir-124-2,hsa-mir-30d,hsa-mir-92a-1,hsa-let-7d,hsa-mir-146b,hsa-mir-7-2,hsa-mir-9-2,hsa-mir-124-3,hsa-mir-376b,hsa-mir-155,hsa-mir-132,hsa-mir-7-1,hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-7-3,hsa-let-7a-3,hsa-mir-29b-2,hsa-mir-122,hsa-mir-133a-2,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-28,hsa-mir-29c,hsa-mir-503,hsa-mir-23a,hsa-mir-98,hsa-mir-146a,hsa-mir-214,hsa-mir-145,hsa-mir-93,hsa-mir-133a-1,hsa-let-7c,hsa-mir-15b,hsa-mir-212,hsa-let-7e,hsa-mir-200b,hsa-mir-191,hsa-mir-124-1,hsa-mir-24-2,hsa-mir-9-3,hsa-let-7a-1,hsa-mir-27a,hsa-mir-130a,hsa-mir-130b
<b>Krankheit</b>					
<b>Diabetes Mellitus, Typ 2</b>	45	1,07E-15	1,34E-12	2,60E-14	hsa-mir-24-1,hsa-mir-9-1,hsa-mir-124-2,hsa-mir-30d,hsa-mir-92a-1,hsa-let-7d,hsa-mir-146b,hsa-mir-7-2,hsa-mir-9-2,hsa-mir-124-3,hsa-mir-376b,hsa-mir-155,hsa-mir-132,hsa-mir-7-1,hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-7-3,hsa-let-7a-3,hsa-mir-29b-2,hsa-mir-122,hsa-mir-133a-2,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-28,hsa-mir-29c,hsa-mir-503,hsa-mir-23a,hsa-mir-98,hsa-mir-146a,hsa-mir-214,hsa-mir-145,hsa-mir-93,hsa-mir-133a-1,hsa-let-7c,hsa-mir-15b,hsa-mir-212,hsa-let-7e,hsa-mir-200b,hsa-mir-191,hsa-mir-124-1,hsa-mir-24-2,hsa-mir-9-3,hsa-let-7a-1,hsa-mir-27a,hsa-mir-130a,hsa-mir-130b
<b>Diabetes Mellitus</b>	36	1,30E-21	1,62E-18	5,82E-20	hsa-let-7a-2,hsa-mir-19b-1,hsa-mir-708,hsa-mir-133a-1,hsa-mir-342,hsa-mir-7-1,hsa-mir-29c,hsa-mir-9-1,hsa-mir-20a,hsa-mir-7-3,hsa-mir-30d,hsa-let-7f-1,hsa-let-7f-2,hsa-mir-26b,hsa-mir-181c,hsa-mir-17,hsa-mir-503,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-130b,hsa-mir-23a,hsa-mir-200b,hsa-let-7a-3,hsa-mir-16-1,hsa-mir-19b-2,hsa-mir-16-2,hsa-mir-146a,hsa-mir-130a,hsa-mir-145,hsa-mir-9-3,hsa-mir-133a-2,hsa-mir-7-2,hsa-mir-9-2,hsa-mir-19a,hsa-let-7a-1,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-155
<b>Chronische Nierenerkrankung</b>	17	4,08E-11	5,09E-08	5,81E-10	hsa-let-7a-2,hsa-mir-133a-1,hsa-mir-29c,hsa-mir-20a,hsa-mir-106b,hsa-mir-26b,hsa-mir-17,hsa-mir-15b,hsa-mir-125b-1,hsa-let-7a-3,hsa-mir-29b-2,hsa-mir-146a,hsa-mir-130a,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-133a-2,hsa-mir-19a,hsa-let-7a-1
<b>Bluthochdruck</b>	14	1,24E-06	1,55E-03	7,26E-06	hsa-let-7b,hsa-mir-139,hsa-mir-24-1,hsa-mir-133a-1,hsa-mir-17,hsa-mir-15b,hsa-mir-98,hsa-mir-31,hsa-mir-146a,hsa-mir-214,hsa-mir-24-2,hsa-mir-122,hsa-mir-133a-2,hsa-mir-155
<b>Fettleibigkeit</b>	13	1,96E-04	2,44E-01	6,84E-04	hsa-mir-125a,hsa-mir-342,hsa-mir-26b,hsa-mir-503,hsa-mir-15b,hsa-mir-130b,hsa-mir-200b,hsa-mir-16-1,hsa-mir-16-2,hsa-mir-146b,hsa-mir-122,hsa-mir-27a,hsa-mir-155

<b>Schwangerschafts-Diabetes</b>	12	5,29E-08	6,60E-05	3,98E-07	hsa-let-7a-2,hsa-mir-362,hsa-mir-9-1,hsa-mir-30d,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-130b,hsa-let-7a-3,hsa-mir-9-3,hsa-mir-9-2,hsa-let-7a-1,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-27a
<b>Diabetische Nephropathie</b>	12	9,83E-08	1,23E-04	7,04E-07	hsa-mir-125a,hsa-mir-342,hsa-mir-124-2,hsa-mir-218-2,hsa-mir-130b,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-124-1,hsa-mir-146a,hsa-mir-214,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-218-1,hsa-mir-124-3
<b>Nierenschädigung</b>	9	3,12E-04	3,89E-01	1,01E-03	hsa-mir-24-1,hsa-let-7c,hsa-mir-20a,hsa-mir-30d,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-24-2,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-122,hsa-mir-155
<b>Akute Nierenschädigung</b>	7	2,68E-04	3,34E-01	8,80E-04	hsa-mir-216a,hsa-mir-216b,hsa-mir-146b,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-145,hsa-mir-200b,hsa-mir-125b-2
<b>Lupus Nephritis</b>	5	3,13E-03	1,00E+00	7,15E-03	hsa-mir-125a,hsa-mir-146a,hsa-mir-130b,hsa-mir-145,hsa-mir-155
<b>Metabolisches Syndrom</b>	4	4,62E-03	1,00E+00	1,03E-02	hsa-mir-146a,hsa-mir-146b,hsa-mir-145,hsa-mir-122
<b>Glomerulonephritis</b>	3	1,67E-02	1,00E+00	2,95E-02	hsa-mir-146a,hsa-mir-200b,hsa-mir-155
<b>Diabetische Vaskulopathie</b>	2	3,91E-02	1,00E+00	6,22E-02	hsa-mir-181c,hsa-mir-503
<b>Transkriptionsfaktor</b>					
<b>MYC</b>	24	3,92E-17	4,89E-14	1,13E-15	hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-19b-1,hsa-mir-29c,hsa-let-7c,hsa-mir-9-1,hsa-mir-20a,hsa-let-7f-1,hsa-let-7f-2,hsa-mir-106b,hsa-mir-26b,hsa-mir-17,hsa-mir-92a-1,hsa-let-7e,hsa-mir-23a,hsa-let-7a-3,hsa-let-7d,hsa-mir-19b-2,hsa-mir-9-3,hsa-mir-9-2,hsa-mir-93,hsa-mir-19a,hsa-let-7a-1,hsa-mir-92a-2
<b>NFKB1</b>	17	3,47E-13	4,32E-10	6,27E-12	hsa-let-7b,hsa-mir-29c,hsa-mir-9-1,hsa-mir-224,hsa-mir-17,hsa-mir-125b-1,hsa-let-7a-3,hsa-mir-16-1,hsa-mir-29b-2,hsa-mir-16-2,hsa-mir-146a,hsa-mir-214,hsa-mir-10b,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-9-3,hsa-mir-9-2,hsa-mir-155
<b>E2F1</b>	12	3,03E-07	3,78E-04	2,02E-06	hsa-mir-20a,hsa-mir-106b,hsa-mir-224,hsa-mir-17,hsa-mir-15b,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-16-1,hsa-mir-16-2,hsa-mir-25,hsa-mir-93,hsa-mir-19a,hsa-mir-92a-2
<b>EGR1</b>	11	1,04E-05	0,013	4,82E-05	hsa-mir-125a,hsa-mir-212,hsa-let-7e,hsa-mir-130b,hsa-mir-23a,hsa-mir-200b,hsa-mir-191,hsa-mir-146b,hsa-mir-10a,hsa-mir-27a,hsa-mir-132
<b>SPI1</b>	10	1,48E-10	1,85E-07	1,95E-09	hsa-mir-338,hsa-mir-17,hsa-mir-146a,hsa-mir-342,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-23a,hsa-mir-19a,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-155,hsa-mir-20a
<b>TGFB1</b>	10	1,28E-06	1,60E-03	7,34E-06	hsa-mir-224,hsa-mir-24-1,hsa-mir-27a,hsa-mir-146a,hsa-mir-205,hsa-mir-23a,hsa-mir-24-2,hsa-mir-200b,hsa-mir-155,hsa-let-7d
<b>TP53</b>	10	1,28E-06	1,60E-03	7,34E-06	hsa-mir-34c,hsa-mir-34b,hsa-mir-215,hsa-mir-29c,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-145,hsa-mir-200b,hsa-mir-155,hsa-mir-125b-2,hsa-mir-29b-2
<b>EIF2C2</b>	9	8,70E-09	1,09E-05	7,69E-08	hsa-let-7f-1,hsa-let-7f-2,hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-let-7a-3,hsa-let-7e,hsa-let-7a-1,hsa-let-7c,hsa-let-7d
<b>LIN28</b>	9	8,70E-09	1,09E-05	7,69E-08	hsa-let-7f-1,hsa-let-7f-2,hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-let-7a-3,hsa-let-7e,hsa-let-7a-1,hsa-let-7c,hsa-let-7d
<b>LIN28B</b>	9	8,70E-09	1,09E-05	7,69E-08	hsa-let-7f-1,hsa-let-7f-2,hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-let-7a-3,hsa-let-7e,hsa-let-7a-1,hsa-let-7c,hsa-let-7d
<b>TRIM32</b>	9	8,70E-09	1,09E-05	7,69E-08	hsa-let-7f-1,hsa-let-7f-2,hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-let-7a-3,hsa-let-7e,hsa-let-7a-1,hsa-let-7c,hsa-let-7d
<b>ZEB1</b>	8	4,44E-06	5,54E-03	2,30E-05	hsa-let-7a-2,hsa-let-7b,hsa-mir-34b,hsa-let-7e,hsa-let-7a-1,hsa-let-7c,hsa-mir-200b,hsa-let-7d
<b>ERS1</b>	7	1,02E-04	0,1277	3,89E-04	hsa-mir-19b-1,hsa-mir-17,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-19b-2,hsa-mir-19a,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-20a
<b>AKT1</b>	5	2,39E-05	0,0298	1,04E-04	hsa-mir-181c,hsa-let-7e,hsa-mir-125b-1,hsa-mir-155,hsa-mir-125b-2
<b>MYCN</b>	5	7,56E-04	0,943	2,05E-03	hsa-mir-17,hsa-mir-92a-1,hsa-mir-19a,hsa-mir-92a-2,hsa-mir-20a
<b>HIF1A</b>	5	1,29E-03	1	3,39E-03	hsa-mir-224,hsa-mir-9-2,hsa-mir-424,hsa-mir-9-3,hsa-mir-9-1
<b>FOXP3</b>	4	5,16E-05	0,0643	2,12E-04	hsa-mir-155,hsa-mir-7-2,hsa-mir-7-3,hsa-mir-7-1
<b>FSH</b>	4	2,41E-04	0,3002	8,14E-04	hsa-mir-15b,hsa-let-7a-3,hsa-let-7a-2,hsa-let-7a-1
<b>STAT5</b>	4	1,47E-03	1	3,80E-03	hsa-mir-17,hsa-mir-15b,hsa-mir-19a,hsa-mir-20a
<b>TWIST1</b>	4	7,19E-03	1	0,0152	hsa-mir-205,hsa-mir-214,hsa-mir-200b,hsa-mir-10b
<b>SP1</b>	4	7,19E-03	1	0,0152	hsa-mir-34c,hsa-mir-19a,hsa-mir-200b,hsa-mir-132
<b>CEBPA</b>	4	0,0106	1	0,0193	hsa-let-7a-2,hsa-let-7a-1,hsa-let-7a-3,hsa-mir-29b-2
<b>TLR2</b>	3	6,17E-04	0,7691	1,86E-03	hsa-mir-125a,hsa-mir-9-1,hsa-mir-146a
<b>TNF</b>	3	6,17E-04	0,7691	1,86E-03	hsa-mir-17,hsa-mir-9-1,hsa-mir-31
<b>CREB1</b>	3	6,17E-04	0,7691	1,86E-03	hsa-mir-132,hsa-mir-212,hsa-mir-9-2
<b>FLI1</b>	3	6,17E-04	0,7691	1,86E-03	hsa-let-7a-3,hsa-let-7a-2,hsa-let-7a-1
<b>NANOG</b>	3	2,31E-03	1	5,68E-03	hsa-mir-17,hsa-mir-20a,hsa-mir-19a
<b>NKX2-5</b>	3	2,31E-03	1	5,68E-03	hsa-mir-17,hsa-mir-20a,hsa-mir-19a
<b>TLX1</b>	3	2,31E-03	1	5,68E-03	hsa-mir-17,hsa-mir-20a,hsa-mir-19a

TLX3	3	2,31E-03	1	5,68E-03	hsa-mir-17,hsa-mir-20a,hsa-mir-19a
REST	3	5,42E-03	1	0,0119	hsa-mir-29c,hsa-mir-132,hsa-mir-9-2
SF2/ASF	3	5,42E-03	1	0,0119	hsa-mir-7-2,hsa-mir-7-3,hsa-mir-7-1
BMP4	3	5,42E-03	1	0,0119	hsa-mir-200b,hsa-mir-205,hsa-mir-145
E2F3	3	0,0167	1	0,0295	hsa-mir-106b,hsa-mir-16-2,hsa-mir-15b
TNFSF12	3	0,0251	1	0,0412	hsa-mir-133a-2,hsa-mir-146a,hsa-mir-133a-1
BMP2	2	7,31E-03	1	0,0153	hsa-mir-31,hsa-mir-24-1
IL1B	2	7,31E-03	1	0,0153	hsa-mir-9-1,hsa-mir-146a
CDX2	2	7,31E-03	1	0,0153	hsa-mir-125b-2,hsa-mir-125b-1
CCND1	2	7,31E-03	1	0,0153	hsa-mir-17,hsa-mir-20a
GNRH1	2	7,31E-03	1	0,0153	hsa-mir-132,hsa-mir-212
BRCA1	2	7,31E-03	1	0,0153	hsa-mir-146a,hsa-mir-146b

#### Anhang-Tabelle 42: IPA-BASIERTE miRNA-mRNA KORRELATIONSANALYSE

Korrelationsanalyse ausgewählter, möglicher Ziel-mRNA im Nierengewebe und signifikant veränderten miRNAs im Urin fettleibiger, 14 bis 26 Wochen alter Ratten verglichen zur schlanken Kontrolle (n=4) mittels IPA Software. MiRNAs wurden mittels miRCURY LNA qRT-PCR Panels (Qiagen) quantifiziert und nach der modifizierten  $\Delta Ct$  Methode analysiert. Ausgewählte miRNAs mit einem multiplen T-Test  $p \leq 0,05$  einschließlich Korrektur mittels FDR und einem Effekt  $\geq 2$ -fach wurden für die Analyse verwendet. mRNA Mengen wurden mit Hilfe von Affymetrix Mikroarrays bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweifachen ANOVA ermittelt ( $BH-q \leq 0,05$ ). FDR: engl. *False discovery rate*. miR: microRNA. OvL: Fettleibig versus schlanke Kontrolle. W: Woche.

miRNA	Effekt OvL	Sicherheitslevel	mRNA	OvL (W14)	OvL (W22)	OvL (W26)
hsa-miR-10a-5p	2,571	Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Tnfrsf11b	-2,042	-1,117	-1,472
		Moderate (predicted)	Alpl	-1,618	-1,532	-1,730
		High (predicted)	Arg2	-1,425	-1,675	-1,751
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Bcl6	-1,760	-2,672	-2,550
		Moderate (predicted)	Anxa13	-4,404	-4,043	-4,375
		Moderate (predicted)	Ptprq	-2,193	-1,831	-1,535
		Moderate (predicted)	Slco4c1	-1,338	-1,754	-1,524
hsa-miR-130b-5p	3,718	Moderate (predicted)	Cbs	-1,376	-1,498	-1,796
		Moderate (predicted)	Dio2	-2,145	-1,826	-2,197
		Moderate (predicted)	Igfbp3	-1,866	-1,495	-2,010
		Moderate (predicted)	Slc1a1	-1,751	-1,417	-1,585
		Moderate (predicted)	Pter	-2,085	-1,279	-1,384
		Moderate (predicted)	Ppm1k	-1,224	-1,821	-1,759
		Moderate (predicted)	Slc25a30	-1,445	-1,421	-1,704
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
hsa-miR-133a-3p	1,005	High (predicted)	Tnfrsf11b	-2,042	-1,117	-1,472
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Moderate (predicted)	Slc4a1	1,001	-2,036	-1,557
		High (predicted)	Fancd2os	-1,914	1,094	-1,069
		High (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		High (predicted)	Slc6a6	-1,219	-2,054	-1,571
		High (predicted)	Rdh16	-1,791	-1,424	-1,661
		Moderate (predicted)	Lpl	-1,146	-1,985	-2,201
hsa-miR-146a-5p	12,533	Moderate (predicted)	Enpp3	-2,310	-2,575	-2,557
		High (predicted)	Ppm1k	-1,224	-1,821	-1,759
		High (predicted)	Slc1a1	-1,751	-1,417	-1,585
		Moderate (predicted)	Paqr9	1,047	-1,455	-1,778
		Moderate (predicted)	Cyp27b1	2,147	-1,091	-1,011
		Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
hsa-miR-15b-5p	2,135	Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Experimentally Observed	Igf1	-2,213	-1,464	-1,493
		Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	Crym	-1,840	-1,419	-1,696
		High (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
Experimentally Observed	F2	-1,558	-1,706	-1,680		

		Moderate (predicted)	Ttc21b	-2,675	-1,863	-1,596
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Slc25a30	-1,445	-1,421	-1,704
		Experimentally Observed	Lamtor5	-2,763	-1,270	-1,747
		High (predicted)	Ihh	-1,773	-1,169	-1,058
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
hsa-miR-184	3,250	Moderate (predicted)	Insig1	-1,880	-1,554	-1,723
		Moderate (predicted)	Osgin1	-1,192	-2,565	-2,359
		Moderate (predicted)	Slc22a12	-1,366	-1,422	-1,712
		Moderate (predicted)	Lipg	-3,167	-2,115	-2,388
		High (predicted)	Cycs	-1,714	-1,236	-1,367
		Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		High (predicted)	Matn1	-1,334	-1,795	-1,753
		Moderate (predicted)	Mpv17l	-2,454	-2,217	-2,835
hsa-miR-19b-3p	2,055	High (predicted)	Igfbp3	-1,866	-1,495	-2,010
		Moderate (predicted)	LOC100360205	-2,230	-1,652	-1,364
		Moderate (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		High (predicted)	Cntfr	-1,093	-1,501	-1,802
		Moderate (predicted)	Igf1	-2,213	-1,464	-1,493
		Moderate (predicted)	Egf	-3,812	-2,607	-2,830
		Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	Slc35d1	-1,773	-1,468	-1,642
		Moderate (predicted)	Slc6a6	-1,219	-2,054	-1,571
hsa-miR-208a-3p	2,084	Moderate (predicted)	Spta1	-1,862	-1,215	-1,167
		Moderate (predicted)	Elov1l	-1,705	-1,158	-1,497
		Moderate (predicted)	Grpr	-1,476	-1,334	-1,977
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		High (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
hsa-miR-208a-5p	3,270	Moderate (predicted)	Tff3	-3,649	-2,922	-3,444
		High (predicted)	Me1	-2,655	-2,882	-3,202
		Moderate (predicted)	Mettl7b	-2,073	-1,687	-1,703
		Moderate (predicted)	Oat	-2,067	-1,697	-2,242
		Moderate (predicted)	Pecr	-3,054	-1,779	-1,965
		Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
hsa-miR-215	1,918	High (predicted)	Tm4sf20	-1,867	-1,121	-1,739
		Moderate (predicted)	Arg2	-1,425	-1,675	-1,751
		Moderate (predicted)	Cycs	-1,714	-1,236	-1,367
		High (predicted)	Mrap	-1,190	-1,504	-1,748
		Moderate (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Tbc1d16	-1,710	-2,120	-2,011
hsa-miR-216a-5p	4,316	Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Ggct	-1,055	-1,928	-2,043
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Slc22a24	-1,463	-1,837	-2,058
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Mapk10	-6,259	-4,725	-4,765
		Moderate (predicted)	Pgm3	-2,045	-1,363	-1,418
		High (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Ugt2b7	-2,594	-1,950	-1,589
hsa-miR-23a-5p	6,680	Moderate (predicted)	C1qtnf3	-2,423	-1,057	-1,086
		Moderate (predicted)	Dio2	-2,145	-1,826	-2,197
		Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		Moderate (predicted)	Grpr	-1,476	-1,334	-1,977
		Moderate (predicted)	Ldhd	-1,724	-1,433	-1,650
		Moderate (predicted)	LOC100360205	-2,230	-1,652	-1,364
		High (predicted)	LOC500124	-1,489	-1,767	-1,805
		Moderate (predicted)	Mcoln2	-1,502	-1,897	-1,976
		Moderate (predicted)	Plekhb2	1,804	1,277	-1,053
		Moderate (predicted)	Slc6a6	-1,219	-2,054	-1,571
hsa-miR-	2,249	Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817

301a-5p		Moderate (predicted)	Tm4sf20	-1,867	-1,121	-1,739
hsa-miR-323a-5p	3,915	Moderate (predicted)	Akr7a3	-1,488	-1,464	-1,936
		High (predicted)	Alpl	-1,618	-1,532	-1,730
		High (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		High (predicted)	Cyp2c24	-1,781	-1,759	-1,798
		High (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
hsa-miR-325	2,779	Moderate (predicted)	Tubb4b	-1,987	1,042	-1,185
		Moderate (predicted)	Matn1	-1,334	-1,795	-1,753
		Moderate (predicted)	Mettl7b	-2,073	-1,687	-1,703
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Sult4a1	-2,345	-1,674	-1,587
hsa-miR-34b-3p	3,771	High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Enpp3	-2,310	-2,575	-2,557
		High (predicted)	Insig1	-1,880	-1,554	-1,723
		Moderate (predicted)	Serpinf2	-2,006	-1,179	-1,541
		Moderate (predicted)	Slc7a13	-1,408	-1,635	-1,737
hsa-miR-34b-5p	4,136	Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		High (predicted)	Akr7a3	-1,488	-1,464	-1,936
		Moderate (predicted)	Arg2	-1,425	-1,675	-1,751
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Gcm1	-2,019	-2,040	-2,080
		Moderate (predicted)	Igfbp3	-1,866	-1,495	-2,010
		Moderate (predicted)	Inmt	-1,059	-1,050	-1,814
		Moderate (predicted)	LOC100360205	-2,230	-1,652	-1,364
		Moderate (predicted)	Mapk10	-6,259	-4,725	-4,765
		Moderate (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
		Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		Moderate (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
		High (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		hsa-miR-34c-3p	3,965	High (predicted)	Sult4a1	-2,345
Moderate (predicted)	Tfrc			-2,279	-1,899	-1,817
Moderate (predicted)	Insig1			-1,880	-1,554	-1,723
Moderate (predicted)	Mep1b			-1,335	-1,529	-1,769
Moderate (predicted)	Serpinf2			-2,006	-1,179	-1,541
hsa-miR-34c-5p	5,057	Moderate (predicted)	Slc2a13	-1,584	-1,791	-1,780
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Moderate (predicted)	Amn	-1,840	-1,317	-1,636
		High (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Bcl6	-1,760	-2,672	-2,550
		High (predicted)	Car7	-1,733	-1,049	-1,389
		Moderate (predicted)	Cftr	-4,476	-3,575	-3,622
		Moderate (predicted)	Igfbp3	-1,866	-1,495	-2,010
		Moderate (predicted)	Inmt	-1,059	-1,050	-1,814
		Experimentally Observed	Jag1	-2,718	-2,978	-2,216
		Moderate (predicted)	LOC100360205	-2,230	-1,652	-1,364
		Moderate (predicted)	Neto2	-2,311	-1,926	-1,990
		High (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		High (predicted)	Serpinf2	-2,006	-1,179	-1,541
		Moderate (predicted)	Slc22a12	-1,366	-1,422	-1,712
		High (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Slc2a13	-1,584	-1,791	-1,780
Moderate (predicted)	Slc5a3	2,043	-1,402	-1,157		
hsa-miR-374b-5p	2,302	Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Moderate (predicted)	Sult4a1	-2,345	-1,674	-1,587
		Moderate (predicted)	Tnfrsf11b	-2,042	-1,117	-1,472
		Moderate (predicted)	Cyp2c11	-8,164	-17,673	-21,034
		Moderate (predicted)	Fmo3	-2,100	-1,112	-1,556
		Moderate (predicted)	Galnt11	-2,128	-1,228	-1,531
		Moderate (predicted)	Mep1b	-1,335	-1,529	-1,769
		High (predicted)	Ntf3	-1,928	-1,135	-1,292
		Moderate (predicted)	Pecr	-3,054	-1,779	-1,965
		Moderate (predicted)	Tmem236	-1,352	-1,781	-1,932
hsa-miR-376b-3p	34,725	High (predicted)	Cdo1	-1,446	-1,424	-1,917
		Moderate (predicted)	Cycs	-1,714	-1,236	-1,367

		Moderate (predicted)	Pdp2	-1,248	-1,426	-1,783
		Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Moderate (predicted)	TC1400000310.rm.1	-2,062	-1,219	-1,359
		Moderate (predicted)	Tmem236	-1,352	-1,781	-1,932
hsa-miR-384	4,246	Moderate (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Moderate (predicted)	Cftr	-4,476	-3,575	-3,622
		Moderate (predicted)	Dio2	-2,145	-1,826	-2,197
		Moderate (predicted)	Gramd1b	-1,364	-1,748	-1,607
		Moderate (predicted)	Rarres1	-2,385	-2,209	-2,302
hsa-miR-484	2,273	Moderate (predicted)	Aldh1l1	-1,527	-1,769	-1,830
		Moderate (predicted)	Azgp1	-1,344	-1,800	-2,188
		Moderate (predicted)	Cntrf	-1,093	-1,501	-1,802
		Moderate (predicted)	Fhl1	-1,669	-1,532	-1,771
		Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		Moderate (predicted)	Igfbp4	-2,058	-2,454	-2,884
		Moderate (predicted)	Lpl	-1,146	-1,985	-2,201
		Moderate (predicted)	Mapk10	-6,259	-4,725	-4,765
		Moderate (predicted)	Pdp2	-1,248	-1,426	-1,783
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		High (predicted)	Serpinf2	-2,006	-1,179	-1,541
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		High (predicted)	Tff3	-3,649	-2,922	-3,444
hsa-miR-487b-3p	14,679	Moderate (predicted)	Dio2	-2,145	-1,826	-2,197
hsa-miR-500a-3p	2,207	Moderate (predicted)	Dio2	-2,145	-1,826	-2,197
		High (predicted)	Me1	-2,655	-2,882	-3,202
		Moderate (predicted)	Pxmp2	-1,306	-1,277	-1,753
		Moderate (predicted)	Tmem236	-1,352	-1,781	-1,932
hsa-miR-504	2,434	Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	B4galnt2	-1,613	-1,707	-2,008
		Moderate (predicted)	C1qtnf3	-2,423	-1,057	-1,086
		Moderate (predicted)	Ldhd	-1,724	-1,433	-1,650
		Moderate (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Moderate (predicted)	Tm4sf20	-1,867	-1,121	-1,739
		Moderate (predicted)	Ace2	-2,217	-1,888	-1,778
hsa-miR-632	2,425	Moderate (predicted)	Alpl	-1,618	-1,532	-1,730
		Moderate (predicted)	Bcl6	-1,760	-2,672	-2,550
		Moderate (predicted)	Car7	-1,733	-1,049	-1,389
		High (predicted)	Ggct	-1,055	-1,928	-2,043
		High (predicted)	Mapk10	-6,259	-4,725	-4,765
		High (predicted)	Mpv17l	-2,454	-2,217	-2,835
		Moderate (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
		Moderate (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
hsa-miR-935	13,947	Moderate (predicted)	Afm	-2,670	-2,135	-2,126
		High (predicted)	Slc22a24	-1,463	-1,837	-2,058
rno-miR-291a-3p	6,148	Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Bcl6	-1,760	-2,672	-2,550
		Moderate (predicted)	Blvra	-2,178	-1,612	-2,148
		High (predicted)	Galnt3	-1,657	-1,765	-1,520
		Moderate (predicted)	Gtpbp4	-1,520	-1,700	-1,602
		Moderate (predicted)	RGD1564999	-3,919	-2,957	-3,100
hsa-miR-122-5p	2,781	Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		High (predicted)	Galnt3	-1,657	-1,765	-1,520
		Moderate (predicted)	Slc15a1	-1,364	-1,461	-1,842
		Moderate (predicted)	Igfbp4	-2,058	-2,454	-2,884
		High (predicted)	Plekhb2	1,804	1,277	-1,053
hsa-miR-124-3p	3,178	High (predicted)	Tnfrsf11b	-2,042	-1,117	-1,472
		High (predicted)	Ctsh	-2,024	-1,028	-1,423



		Moderate (predicted)	Slc5a3	2,043	-1,402	-1,157
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Experimentally Observed	Jag1	-2,718	-2,978	-2,216
		Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		Experimentally Observed	Elovl1	-1,705	-1,158	-1,497
		Moderate (predicted)	Bcl6	-1,760	-2,672	-2,550
		Moderate (predicted)	Tmem236	-1,352	-1,781	-1,932
		High (predicted)	Paqr9	1,047	-1,455	-1,778
		High (predicted)	Pecr	-3,054	-1,779	-1,965
		Moderate (predicted)	LOC100360205	-2,230	-1,652	-1,364
		Moderate (predicted)	Slco4c1	-1,338	-1,754	-1,524
		Moderate (predicted)	Ptpqr	-2,193	-1,831	-1,535
		Experimentally Observed	Slc25a30	-1,445	-1,421	-1,704
		Moderate (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
hsa-miR-139-5p	-1,560	Moderate (predicted)	Jun	2,224	1,640	1,612
		High (predicted)	Tgif1	1,888	1,292	2,029
		Moderate (predicted)	LOC100359539	1,293	1,763	2,200
		High (predicted)	Slc17a4	1,470	2,142	2,216
		High (predicted)	Casp3	1,281	1,707	1,327
		Moderate (predicted)	Top2a	1,172	1,615	1,756
		Moderate (predicted)	P2ry12	1,309	1,294	2,046
		Moderate (predicted)	Spock1	1,828	1,275	1,164
		Moderate (predicted)	Abca1	3,414	-1,140	1,267
		Experimentally Observed	Runx1	1,822	1,588	1,922
		Moderate (predicted)	Slc25a30	-1,445	-1,421	-1,704
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Sema6a	1,730	-1,164	-1,015
		High (predicted)	Pgm3	-2,045	-1,363	-1,418
		Moderate (predicted)	Lamtor5	-2,763	-1,270	-1,747
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Paqr9	1,047	-1,455	-1,778
		Moderate (predicted)	Tnfrsf11b	-2,042	-1,117	-1,472
		Moderate (predicted)	B4galnt2	-1,613	-1,707	-2,008
		Moderate (predicted)	Cfr	-4,476	-3,575	-3,622
		Moderate (predicted)	Paqr9	1,047	-1,455	-1,778
		Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		High (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
		Moderate (predicted)	Bcl6	-1,760	-2,672	-2,550
		Moderate (predicted)	Insig1	-1,880	-1,554	-1,723
		High (predicted)	Azgp1	-1,344	-1,800	-2,188
		Moderate (predicted)	Pdp2	-1,248	-1,426	-1,783
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Aldh1b1	-1,796	-1,440	-1,753
		Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	Egf	-3,812	-2,607	-2,830
		High (predicted)	Reep6	-2,107	-2,373	-2,256
		High (predicted)	Slc6a13	-1,425	-1,569	-1,858
		Moderate (predicted)	Ddi2	-1,055	-1,987	-1,670
		High (predicted)	Casq1	-1,807	-1,241	-1,655
		Moderate (predicted)	Dcxr	-1,829	1,072	-1,453
		Moderate (predicted)	Car7	-1,733	-1,049	-1,389
		Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		Moderate (predicted)	Slc6a6	-1,219	-2,054	-1,571
		Moderate (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
		High (predicted)	Mlc1	-1,628	-2,168	-2,494
		Moderate (predicted)	Cyp8b1	-12,550	-5,380	-7,304
		High (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Gss	-1,848	-1,249	-1,535
		Moderate (predicted)	Slc22a12	-1,366	-1,422	-1,712
		Moderate (predicted)	Igfbp3	-1,866	-1,495	-2,010
hsa-miR-188-5p	8,418	Moderate (predicted)	Paqr9	1,047	-1,455	-1,778
		High (predicted)	Cyp27b1	2,147	-1,091	-1,011
hsa-miR-191-5p	2,069	Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	Dbp	-2,259	1,083	-1,078
hsa-miR-	2,743	Moderate (predicted)	Ahcy	-1,918	-2,149	-2,508

212-3p		Moderate (predicted)	Ggh	-1,303	-1,025	-1,721
		Moderate (predicted)	Insig1	-1,880	-1,554	-1,723
		High (predicted)	Melk	-1,702	-1,268	-1,556
		Experimentally Observed	Mmp9	-1,809	1,003	-1,044
		Moderate (predicted)	Ntf3	-1,928	-1,135	-1,292
		Moderate (predicted)	Slco4c1	-1,338	-1,754	-1,524
hsa-miR-299-5p	4,588	Moderate (predicted)	Arg2	-1,425	-1,675	-1,751
		Moderate (predicted)	Ddi2	-1,055	-1,987	-1,670
		Moderate (predicted)	Enpp3	-2,310	-2,575	-2,557
		Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		Moderate (predicted)	Ppm1k	-1,224	-1,821	-1,759
		High (predicted)	Sult4a1	-2,345	-1,674	-1,587
hsa-miR-338-5p	2,025	Moderate (predicted)	Nr1d1	-2,009	-1,713	-1,480
		Moderate (predicted)	Ntf3	-1,928	-1,135	-1,292
hsa-miR-342-3p	2,290	Moderate (predicted)	Frmd3	-1,710	-1,628	-1,568
		Moderate (predicted)	Inmt	-1,059	-1,050	-1,814
		High (predicted)	Matn1	-1,334	-1,795	-1,753
		High (predicted)	Plekhb2	1,804	1,277	-1,053
		Moderate (predicted)	Ppm1k	-1,224	-1,821	-1,759
		Moderate (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
hsa-miR-342-5p	4,171	High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Azgp1	-1,344	-1,800	-2,188
		High (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Csad	-1,368	-2,115	-2,341
		Moderate (predicted)	Cyp8b1	-12,550	-5,380	-7,304
		High (predicted)	Gcm1	-2,019	-2,040	-2,080
		Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		High (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
		Moderate (predicted)	Rdh16	-1,791	-1,424	-1,661
hsa-miR-411-5p	1,647	Moderate (predicted)	Tbc1d16	-1,710	-2,120	-2,011
		Moderate (predicted)	Enpp3	-2,310	-2,575	-2,557
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Sult4a1	-2,345	-1,674	-1,587
hsa-miR-431-5p	3,172	Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	Lipg	-3,167	-2,115	-2,388
hsa-miR-488-5p	2,259	Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		Moderate (predicted)	Galnt14	-1,751	-1,476	-1,641
		Moderate (predicted)	Gcm1	-2,019	-2,040	-2,080
		Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		Moderate (predicted)	Slc1a1	-1,751	-1,417	-1,585
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		High (predicted)	Tff3	-3,649	-2,922	-3,444
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
hsa-miR-598-3p	2,570	Moderate (predicted)	Tnfrsf11b	-2,042	-1,117	-1,472
hsa-miR-708-5p	2,140	High (predicted)	Jag1	-2,718	-2,978	-2,216
		Moderate (predicted)	Acsf2	-1,704	-1,804	-2,158
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		High (predicted)	Cidec	-2,534	-1,783	-1,649
		High (predicted)	Cnfr	-1,093	-1,501	-1,802
		Moderate (predicted)	Mettl7b	-2,073	-1,687	-1,703
		Moderate (predicted)	Serpinf2	-2,006	-1,179	-1,541
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Slc25a30	-1,445	-1,421	-1,704
hsa-miR-874-3p	2,630	Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		High (predicted)	B4galnt2	-1,613	-1,707	-2,008
		Moderate (predicted)	Cxcl12	-1,990	-1,244	-1,607
		Moderate (predicted)	Ddi2	-1,055	-1,987	-1,670
		Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	Matn1	-1,334	-1,795	-1,753
		High (predicted)	Mettl7b	-2,073	-1,687	-1,703
		Moderate (predicted)	Plekhb2	1,804	1,277	-1,053
		Moderate (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
		High (predicted)	RGD1564999	-3,919	-2,957	-3,100

		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Slc22a13	-3,908	-4,664	-5,051
		High (predicted)	Slc22a25	-1,760	-1,134	-1,675
		Moderate (predicted)	Slc22a7	-2,403	-1,743	-1,744
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
hsa-miR-125b-1-3p	6,015	Moderate (predicted)	Lpl	-1,146	-1,985	-2,201
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		High (predicted)	Reep6	-2,107	-2,373	-2,256
		Moderate (predicted)	Pecr	-3,054	-1,779	-1,965
		Moderate (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
		High (predicted)	Grpr	-1,476	-1,334	-1,977
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Tnfrsf11b	-2,042	-1,117	-1,472
hsa-let-7f-2-3p	2,453	Moderate (predicted)	Elovl1	-1,705	-1,158	-1,497
		Moderate (predicted)	C1qtnf3	-2,423	-1,057	-1,086
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Gtpbp4	-1,520	-1,700	-1,602
		Moderate (predicted)	Enpp3	-2,310	-2,575	-2,557
		Moderate (predicted)	Cycs	-1,714	-1,236	-1,367
		Moderate (predicted)	C1qtnf3	-2,423	-1,057	-1,086
		High (predicted)	Cxcl12	-1,990	-1,244	-1,607
hsa-miR-219a-2-3p	3,744	Moderate (predicted)	Cyp2c24	-1,781	-1,759	-1,798
		Moderate (predicted)	Cyp8b1	-12,550	-5,380	-7,304
		High (predicted)	Pgm3	-2,045	-1,363	-1,418
		Moderate (predicted)	Pter	-2,085	-1,279	-1,384
		Moderate (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Moderate (predicted)	Esm1	-1,968	-1,356	-1,342
		Moderate (predicted)	Oat	-2,067	-1,697	-2,242
hsa-miR-9-3p	3,281	Moderate (predicted)	Oxnad1	-1,795	-1,755	-1,903
		Moderate (predicted)	Pdp2	-1,248	-1,426	-1,783
		High (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Moderate (predicted)	Alpl	-1,618	-1,532	-1,730
		Moderate (predicted)	Enpp3	-2,310	-2,575	-2,557
		Moderate (predicted)	Pgm3	-2,045	-1,363	-1,418
hsa-miR-29b-2-5p	2,257	Moderate (predicted)	Sorl1	-1,065	-1,707	-1,256
		Moderate (predicted)	Sult2a1	-2,586	-1,667	-1,821
		Moderate (predicted)	Susd3	-1,974	-1,357	-1,667
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Galnt3	-1,657	-1,765	-1,520
hsa-miR-7-5p	2,383	Moderate (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
		Moderate (predicted)	Slc5a3	2,043	-1,402	-1,157
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Tmem236	-1,352	-1,781	-1,932
		Moderate (predicted)	Crym	-1,840	-1,419	-1,696
rno-miR-343	2,682	Moderate (predicted)	Gramd1b	-1,364	-1,748	-1,607
		Moderate (predicted)	LOC500124	-1,489	-1,767	-1,805
		Moderate (predicted)	Paqr9	1,047	-1,455	-1,778
		Moderate (predicted)	Sult4a1	-2,345	-1,674	-1,587
<b>Gesamturin</b>						
		High (predicted)	Ddi2	-1,055	-1,987	-1,670
		Moderate (predicted)	Pdp2	-1,248	-1,426	-1,783
		Moderate (predicted)	Tmem144	-1,713	-1,521	-1,650
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
hsa-let-7i-5p	3,320	High (predicted)	Slc5a9	-4,079	-2,663	-2,732
		Experimentally Observed	Fads2	1,272	-1,460	-1,727
		High (predicted)	Arg2	-1,425	-1,675	-1,751
		Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		Moderate (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
		Experimentally Observed	F2	-1,558	-1,706	-1,680
		Moderate (predicted)	Galnt3	-1,657	-1,765	-1,520
hsa-miR-106b-5p	4,260	Moderate (predicted)	Neto2	-2,311	-1,926	-1,990
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Moderate (predicted)	Lamtor5	-2,763	-1,270	-1,747
hsa-miR-130b-3p	2,088	High (predicted)	Igf1	-2,213	-1,464	-1,493
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639

		High (predicted)	Slc6a6	-1,219	-2,054	-1,571
		Moderate (predicted)	Cxcl12	-1,990	-1,244	-1,607
		Moderate (predicted)	Tmem236	-1,352	-1,781	-1,932
		Moderate (predicted)	Slc35d1	-1,773	-1,468	-1,642
		Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
hsa-miR-154-3p	2,164	Moderate (predicted)	Lpl	-1,146	-1,985	-2,201
		Moderate (predicted)	Galnt11	-2,128	-1,228	-1,531
		High (predicted)	Cxcl12	-1,990	-1,244	-1,607
		Moderate (predicted)	Galnt3	-1,657	-1,765	-1,520
		Moderate (predicted)	Gc	-2,823	-3,403	-3,867
hsa-miR-155-5p	3,342	Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Plekhb2	1,804	1,277	-1,053
		Moderate (predicted)	Ptprq	-2,193	-1,831	-1,535
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Cyp2c11	-8,164	-17,673	-21,034
		Experimentally Observed	Lpl	-1,146	-1,985	-2,201
		High (predicted)	Tmem236	-1,352	-1,781	-1,932
		Moderate (predicted)	Mapk10	-6,259	-4,725	-4,765
		Experimentally Observed	F2	-1,558	-1,706	-1,680
		Experimentally Observed	Fads1	-1,693	-1,983	-1,697
		Moderate (predicted)	Ttc21b	-2,675	-1,863	-1,596
hsa-miR-181c-5p	4,770	High (predicted)	Acot12	1,245	-1,580	-1,953
		Moderate (predicted)	Melk	-1,702	-1,268	-1,556
		Moderate (predicted)	Ggct	-1,055	-1,928	-2,043
		Moderate (predicted)	Mpv17l	-2,454	-2,217	-2,835
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Acmsd	-1,905	1,016	-1,582
		High (predicted)	Esm1	-1,968	-1,356	-1,342
		High (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
		High (predicted)	Tnfrsf11b	-2,042	-1,117	-1,472
		Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		Moderate (predicted)	Osgin1	-1,192	-2,565	-2,359
hsa-miR-184	4,618	Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	Insig1	-1,880	-1,554	-1,723
		High (predicted)	Cycs	-1,714	-1,236	-1,367
		Moderate (predicted)	Lipg	-3,167	-2,115	-2,388
		Moderate (predicted)	Slc22a12	-1,366	-1,422	-1,712
		High (predicted)	Matn1	-1,334	-1,795	-1,753
		Moderate (predicted)	Mpv17l	-2,454	-2,217	-2,835
		Moderate (predicted)	Pter	-2,085	-1,279	-1,384
hsa-miR-190b-5p	2,388	High (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		High (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	LOC100360205	-2,230	-1,652	-1,364
hsa-miR-19a-3p	5,140	Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		Moderate (predicted)	Spta1	-1,862	-1,215	-1,167
		High (predicted)	Cntfr	-1,093	-1,501	-1,802
		Moderate (predicted)	Egf	-3,812	-2,607	-2,830
		Moderate (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		High (predicted)	Igfbp3	-1,866	-1,495	-2,010
		Moderate (predicted)	Slc35d1	-1,773	-1,468	-1,642
		Moderate (predicted)	Igf1	-2,213	-1,464	-1,493
		Moderate (predicted)	Slc6a6	-1,219	-2,054	-1,571
		Moderate (predicted)	Esm1	-1,968	-1,356	-1,342
hsa-miR-205-5p	2,416	Moderate (predicted)	Slc51a	-2,227	-1,120	-1,376
		Moderate (predicted)	Epb41l4b	-1,680	-1,848	-1,475
		High (predicted)	Tmem144	-1,713	-1,521	-1,650
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	Kcnt1	-1,120	-1,835	-1,718
hsa-miR-218-5p	2,715	Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		High (predicted)	Galnt3	-1,657	-1,765	-1,520
		High (predicted)	Cyp2c24	-1,781	-1,759	-1,798
		Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	Sema6a	1,730	-1,164	-1,015

		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Experimentally Observed	Cxcl12	-1,990	-1,244	-1,607
		Moderate (predicted)	Cycs	-1,714	-1,236	-1,367
		Moderate (predicted)	Ggct	-1,055	-1,928	-2,043
		Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	Melk	-1,702	-1,268	-1,556
		Moderate (predicted)	Oxnad1	-1,795	-1,755	-1,903
		Moderate (predicted)	Paqr9	1,047	-1,455	-1,778
		Moderate (predicted)	Ppm1k	-1,224	-1,821	-1,759
		Moderate (predicted)	Slc1a1	-1,751	-1,417	-1,585
		Moderate (predicted)	Slco4c1	-1,338	-1,754	-1,524
		Moderate (predicted)	TC1400000310.rm.1	-2,062	-1,219	-1,359
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Tmem144	-1,713	-1,521	-1,650
		High (predicted)	Acsf2	-1,704	-1,804	-2,158
		Moderate (predicted)	Cbs	-1,376	-1,498	-1,796
		Moderate (predicted)	Gramd1b	-1,364	-1,748	-1,607
		High (predicted)	Inmt	-1,059	-1,050	-1,814
		Moderate (predicted)	Insig1	-1,880	-1,554	-1,723
		Moderate (predicted)	Nr1d1	-2,009	-1,713	-1,480
		Moderate (predicted)	Pdp2	-1,248	-1,426	-1,783
		High (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
		Moderate (predicted)	Slc22a25	-1,760	-1,134	-1,675
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Slc4a1	1,001	-2,036	-1,557
		Moderate (predicted)	Galnt3	-1,657	-1,765	-1,520
		Moderate (predicted)	Jag1	-2,718	-2,978	-2,216
		Moderate (predicted)	Slc1a1	-1,751	-1,417	-1,585
		Moderate (predicted)	Slc2a13	-1,584	-1,791	-1,780
		Moderate (predicted)	Susd3	-1,974	-1,357	-1,667
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Moderate (predicted)	Fancd2os	-1,914	1,094	-1,069
		Moderate (predicted)	Galnt3	-1,657	-1,765	-1,520
		Moderate (predicted)	Gpd2	-2,180	-1,333	-1,103
		Experimentally Observed	Igf1	-2,213	-1,464	-1,493
		Moderate (predicted)	Lpl	-1,146	-1,985	-2,201
		Moderate (predicted)	Paqr9	1,047	-1,455	-1,778
		Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	Sema6a	1,730	-1,164	-1,015
		Moderate (predicted)	Sorl1	-1,065	-1,707	-1,256
		Moderate (predicted)	Acsf2	-1,704	-1,804	-2,158
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		High (predicted)	Cidec	-2,534	-1,783	-1,649
		High (predicted)	Cntfr	-1,093	-1,501	-1,802
		Moderate (predicted)	Mettl7b	-2,073	-1,687	-1,703
		Moderate (predicted)	Serpinf2	-2,006	-1,179	-1,541
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Slc25a30	-1,445	-1,421	-1,704
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Grpr	-1,476	-1,334	-1,977
		Moderate (predicted)	Plekhh2	1,804	1,277	-1,053
		Moderate (predicted)	Acy3	-1,477	-1,366	-1,769
		High (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Moderate (predicted)	Aldh1b1	-1,796	-1,440	-1,753
		High (predicted)	Cxcl12	-1,990	-1,244	-1,607
		Moderate (predicted)	Lipg	-3,167	-2,115	-2,388
		Moderate (predicted)	LOC100360205	-2,230	-1,652	-1,364
		Moderate (predicted)	Pdp2	-1,248	-1,426	-1,783
		Experimentally Observed	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	Slc22a25	-1,760	-1,134	-1,675
		Moderate (predicted)	Slc51a	-2,227	-1,120	-1,376
		Moderate (predicted)	Slc6a6	-1,219	-2,054	-1,571
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Csad	-1,368	-2,115	-2,341
		Moderate (predicted)	Plekhh2	1,804	1,277	-1,053

		Moderate (predicted)	Slc51a	-2,227	-1,120	-1,376
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
hsa-miR-342-3p	2,262	Moderate (predicted)	Frmd3	-1,710	-1,628	-1,568
		Moderate (predicted)	Inmt	-1,059	-1,050	-1,814
		High (predicted)	Matn1	-1,334	-1,795	-1,753
		High (predicted)	Plekhhb2	1,804	1,277	-1,053
		Moderate (predicted)	Ppm1k	-1,224	-1,821	-1,759
		Moderate (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
				Moderate (predicted)	Enpp3	-2,310
hsa-miR-34b-3p	23,855	High (predicted)	Insig1	-1,880	-1,554	-1,723
		Moderate (predicted)	Serpinf2	-2,006	-1,179	-1,541
		Moderate (predicted)	Slc7a13	-1,408	-1,635	-1,737
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		High (predicted)	Akr7a3	-1,488	-1,464	-1,936
hsa-miR-34b-5p	4,578	Moderate (predicted)	Arg2	-1,425	-1,675	-1,751
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Gcm1	-2,019	-2,040	-2,080
		Moderate (predicted)	Igfbp3	-1,866	-1,495	-2,010
		Moderate (predicted)	Inmt	-1,059	-1,050	-1,814
		Moderate (predicted)	LOC100360205	-2,230	-1,652	-1,364
		Moderate (predicted)	Mapk10	-6,259	-4,725	-4,765
		Moderate (predicted)	Prima1	2,298	-1,044	-1,367
		Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		Moderate (predicted)	Scd	-1,233	-4,253	-3,349
		High (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		High (predicted)	Sult4a1	-2,345	-1,674	-1,587
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		hsa-miR-34c-5p	9,216	Moderate (predicted)	Ak4	-2,157
Moderate (predicted)	Amn			-1,840	-1,317	-1,636
High (predicted)	B3galt5			-1,615	-1,858	-1,710
Moderate (predicted)	Bcl6			-1,760	-2,672	-2,550
High (predicted)	Car7			-1,733	-1,049	-1,389
Moderate (predicted)	Cfr			-4,476	-3,575	-3,622
Moderate (predicted)	Igfbp3			-1,866	-1,495	-2,010
Moderate (predicted)	Inmt			-1,059	-1,050	-1,814
Experimentally Observed	Jag1			-2,718	-2,978	-2,216
Moderate (predicted)	LOC100360205			-2,230	-1,652	-1,364
Moderate (predicted)	Neto2			-2,311	-1,926	-1,990
High (predicted)	Satb2			-1,233	-1,711	-1,174
High (predicted)	Serpinf2			-2,006	-1,179	-1,541
Moderate (predicted)	Slc22a12			-1,366	-1,422	-1,712
High (predicted)	Slc23a3			-1,779	-1,831	-1,717
Moderate (predicted)	Slc2a13			-1,584	-1,791	-1,780
Moderate (predicted)	Slc5a3			2,043	-1,402	-1,157
Moderate (predicted)	Stc1			-1,520	-2,174	-1,639
Moderate (predicted)	Sult4a1			-2,345	-1,674	-1,587
Moderate (predicted)	Tnfrsf11b			-2,042	-1,117	-1,472
hsa-miR-362-3p	5,524	High (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Cxcl12	-1,990	-1,244	-1,607
		Moderate (predicted)	Esm1	-1,968	-1,356	-1,342
		Moderate (predicted)	Igfbp4	-2,058	-2,454	-2,884
		Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	Neto2	-2,311	-1,926	-1,990
		Moderate (predicted)	Slc6a6	-1,219	-2,054	-1,571
		Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
hsa-miR-376b-3p	2,920	High (predicted)	Cdo1	-1,446	-1,424	-1,917
		Moderate (predicted)	Cycs	-1,714	-1,236	-1,367
		Moderate (predicted)	Pdp2	-1,248	-1,426	-1,783
		Moderate (predicted)	Prlr	-4,817	-2,470	-2,596
		Moderate (predicted)	Samd5	-1,471	-2,058	-1,145
		Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
		Moderate (predicted)	TC1400000310.rm.1	-2,062	-1,219	-1,359

hsa-miR-450a-5p	3,839	Moderate (predicted)	Tmem236	-1,352	-1,781	-1,932
		Moderate (predicted)	Cxcl12	-1,990	-1,244	-1,607
		Moderate (predicted)	Ddi2	-1,055	-1,987	-1,670
		Moderate (predicted)	Fhl1	-1,669	-1,532	-1,771
hsa-miR-497-5p	5,093	Experimentally Observed	Lamtor5	-2,763	-1,270	-1,747
		Moderate (predicted)	Ttc21b	-2,675	-1,863	-1,596
		High (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		Moderate (predicted)	Slc25a30	-1,445	-1,421	-1,704
		High (predicted)	Ihh	-1,773	-1,169	-1,058
		Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Experimentally Observed	Igf1	-2,213	-1,464	-1,493
		Moderate (predicted)	Crym	-1,840	-1,419	-1,696
		High (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Experimentally Observed	F2	-1,558	-1,706	-1,680
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
hsa-miR-503-5p	5,350	High (predicted)	Ak4	-2,157	-1,033	-1,213
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Ihh	-1,773	-1,169	-1,058
		High (predicted)	Lipg	-3,167	-2,115	-2,388
hsa-miR-532-3p	2,924	Moderate (predicted)	Mlc1	-1,628	-2,168	-2,494
		Moderate (predicted)	Esm1	-1,968	-1,356	-1,342
		High (predicted)	Igfbp4	-2,058	-2,454	-2,884
		Moderate (predicted)	Slc23a3	-1,779	-1,831	-1,717
hsa-miR-92a-3p	2,198	Moderate (predicted)	Spta1	-1,862	-1,215	-1,167
		Moderate (predicted)	Gcm1	-2,019	-2,040	-2,080
		Moderate (predicted)	Gramd1b	-1,364	-1,748	-1,607
		Moderate (predicted)	LOC100360205	-2,230	-1,652	-1,364
		High (predicted)	Mcoln2	-1,502	-1,897	-1,976
		Moderate (predicted)	Me1	-2,655	-2,882	-3,202
		High (predicted)	Plekhh2	1,804	1,277	-1,053
		Moderate (predicted)	Ptprq	-2,193	-1,831	-1,535
mmu-miR-1839-5p	2,511	Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		High (predicted)	Inmt	-1,059	-1,050	-1,814
		Moderate (predicted)	Aldh1b1	-1,796	-1,440	-1,753
		Moderate (predicted)	Rarres1	-2,385	-2,209	-2,302
		Moderate (predicted)	Satb2	-1,233	-1,711	-1,174
		Moderate (predicted)	Paqr9	1,047	-1,455	-1,778
		Moderate (predicted)	Igfbp3	-1,866	-1,495	-2,010
		Moderate (predicted)	Cdo1	-1,446	-1,424	-1,917
		Moderate (predicted)	Lamtor5	-2,763	-1,270	-1,747
mmu-miR-672-5p	3,860	High (predicted)	Acy3	-1,477	-1,366	-1,769
		High (predicted)	Cxcl12	-1,990	-1,244	-1,607
		Moderate (predicted)	Cyp2c24	-1,781	-1,759	-1,798
		Moderate (predicted)	Mettl7b	-2,073	-1,687	-1,703
		Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639
rno-miR-351-5p	4,064	Moderate (predicted)	Tfrc	-2,279	-1,899	-1,817
		High (predicted)	Galnt14	-1,751	-1,476	-1,641
		Experimentally Observed	Gss	-1,848	-1,249	-1,535
		Experimentally Observed	Igfbp3	-1,866	-1,495	-2,010
		High (predicted)	Mrap	-1,190	-1,504	-1,748
		High (predicted)	B3galt5	-1,615	-1,858	-1,710
		Moderate (predicted)	Fads2	1,272	-1,460	-1,727
		Moderate (predicted)	Cyts	-1,714	-1,236	-1,367
		Moderate (predicted)	Elov1	-1,705	-1,158	-1,497
		Moderate (predicted)	lyd	-1,294	-1,285	-1,701
		Moderate (predicted)	Sult4a1	-2,345	-1,674	-1,587
		Experimentally Observed	TC140000310.rm.1	-2,062	-1,219	-1,359
		Moderate (predicted)	Slc22a13	-3,908	-4,664	-5,051
Moderate (predicted)	Stc1	-1,520	-2,174	-1,639		
Experimentally Observed	Scd	-1,233	-4,253	-3,349		

### Anhang-Tabelle 43: ZYTOTOXIZITÄTS VON HRPTECS NACH BEHANDLUNG MIT TGF-B ODER HSA

Rohdaten der Zytotoxizitätsbestimmung von hRPTECs nach Behandlung mit TGF- $\beta$  (10 ng/ml) oder HSA (20 mg/ml) für 48 Stunden (n=3) mit Hilfe des LDH-Assays. hRPTEC: humane renale proximale Tubulusepithelzellen. TGF- $\beta$ : engl. *Tumor growth factor beta*. HSA: Humanes Serum-albumin. LDH: Laktat-Dehydrogenase.

		Technische Replikate			
Kontrolle	Replik 1	0,827	1,146	2,597	0,954
	Replik 2	0,67	0,875	0,739	1,107
	Replik 3	0,542	0,734	0,578	0,647
TGF- $\beta$	Replik 1	1,238	1,347	2,179	1,458
	Replik 2	0,935	1,084	1,134	0,947
	Replik 3	0,875	0,895	0,772	0,832
HSA	Replik 1	2,12	0,822	2,439	1,361
	Replik 2	0,775	1,073	0,77	0,896
	Replik 3	0,921	0,663	0,701	0,491
Hintergrund	Replik 1	0,051	0,054		
	Replik 2	0,048	0,049		
	Replik 3	0,048	0,049		

### Anhang-Tabelle 44: ROHDATEN DER BESTIMMUNG DER GENEXPRESSION VON BEKANNTEN TGF-B ZIELGENEN IN HRPTECS NACH BEHANDLUNG MIT TGF-B

Rohdaten der Genexpressionsbestimmung bekannter TGF- $\beta$  Zielgenen in hRPTECs nach Behandlung mit TGF- $\beta$  (1 und 10 ng/ml) für 48 Stunden (n=3). mRNA wurde mittels TaqMan-basierter qRT-PCR quantifiziert. Gezeigt sind Ct-Werte. hRPTEC: humane renale proximale Tubulusepithelzellen. TGF- $\beta$ : engl. *Tumor growth factor beta*.

mRNA	Kontrolle						TGF- $\beta$ (1 ng/ml)						TGF- $\beta$ (10 ng/ml)					
	PPIA	19,3	19,4	19,6	19,6	19,6	19,8	19,4	19,5	19,7	19,7	19,9	19,8	19,3	19,6	19,7	19,9	19,8
COL1A1	26,8	26,4	27,5	27,1	27,4	27,7	26,1	26,2	27,0	26,6	27,0	27,2	25,5	25,5	26,2	26,1	26,4	26,6
COL4A1	20,3	20,3	20,9	20,7			20,4	20,4	20,8	20,7			20,7	20,5	20,9	20,9		
ACTA2	28,2	28,3	28,6	28,4			28,5	28,5	28,5	28,5			28,6	28,7	28,6	28,7		
VIM	20,6	20,6	20,9	20,8	21,1	21,1	20,6	20,6	20,8	20,7	21,0	21,0	20,2	20,2	20,3	20,4	20,4	20,5
CDH11	35,4	35,5	35,5	35,7	34,7	34,2	35,4	34,8	34,7	34,2	33,8	34,1	33,9	34,0	33,8	33,2	33,0	33,5
CTGF	20,1	20,2	20,5	20,5	20,3	20,3	20,8	20,8	21,0	21,0	20,9	20,9	21,5	21,5	21,8	21,8	21,6	21,7
MMP2	25,9	25,8	26,4	26,3	26,2	26,2	24,5	24,5	24,8	24,9	24,8	24,8	22,3	22,2	22,4	22,4	22,2	22,2
SERPINE1	26,7	26,7	27,0	27,0	27,3	27,2	26,6	26,6	26,6	26,6	27,2	27,2	24,5	24,6	24,2	24,3	24,6	24,8
FN1	20,3	20,3	20,5	20,4	19,6	19,8	19,8	19,8	19,6	19,7	19,2	19,1	18,6	18,7	18,5	18,6	17,9	17,6
IL11	29,4	29,5	29,5	29,6	28,6	28,8	30,2	30,2	30,0	29,9	29,1	28,9	28,2	28,2	28,5	28,7	27,8	27,9

### Anhang-Tabelle 45: ROHDATEN DER BESTIMMUNG DER GENEXPRESSION VON BEKANNTEN HSA ZIELGENEN IN HRPTECS NACH BEHANDLUNG MIT HSA

Rohdaten der Genexpressionsbestimmung bekannter HSA Zielgenen in hRPTECs nach Behandlung mit HSA (10 und 20 mg/ml) für 48 Stunden (n=3). mRNA wurde mittels TaqMan-basierter qRT-PCR quantifiziert. Gezeigt sind Ct-Werte. hRPTEC: humane renale proximale Tubulusepithelzellen. HSA: Humanes Serumalbumin.

	PPIA	TGFB1	TIMP1	CHAC1	COL1A1	IL6	FN
Kontrolle	19,3	23,2	24,3	26,4	27,3	26,1	21,0
HSA (10 mg)	19,1	22,6	23,8	26,1	25,9	27,4	20,9
HSA (20 mg)	19,1	22,6	23,8	26,0	26,0	27,3	20,7



**ANHANG-TABELLE 46: ROHDATEN DES MIRNA-PROFILING IN HRPTECS UND ZELLKULTURMEDIUM *IN VITRO***

Rohdaten der miRNA-Quantifizierung im Zellkulturmedium und Zellen nach Behandlung von hRPTECs mit HSA (20 mg/ml) oder TGF-β1 (10 ng/ml) für 48h (n=3). MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Panels (Qiagen) quantifiziert. EVs wurden aus 80 ml Zellkulturmedium mit Hilfe des *miRCURY Exosome Isolation Kits* (Qiagen) isoliert. Gezeigt sind Ct-Werte. hRPTEC: humane renale proximale Tubulusepithelzellen. TGF-β: engl. *Tumor growth factor beta*. HSA: Humanes Serumalbumin. EV: Extrazelluläre Vesikel. CCM: engl. *Cell-conditioned medium* (Zellen-konditioniertes Medium).

miRNA	CCM-EV			CCM (gesamt)			hRPTECs					
	Kontrolle	TGF-β	HSA	Kontrolle	TGF-β	HSA	Kontrolle	TGF-β	HSA			
miR-24-3p	18,5	15,5	20,2	22,2	21,2	22,4	18,3	17,5	18,6			
	18,9	15,9	21,7				18,7	17,9	19,1			
	18,5	14,6	20,0				17,9	18,1	17,9			
	19,0	15,0	21,7				18,1	18,6	18,2			
	18,7	15,0	21,1				18,5	18,0	18,1			
miR-9-3p	19,0	15,5	22,7	33,5	35,2	33,4	19,	18,3	18,7			
	31,3	28,1	32,2				31,9	30,8	31,7			
	31,2	28,3	33,4				32,1	30,9	32,1			
	31,0	28,3	31,4				31,0	31,3	31,1			
	31,4	28,1	32,9				31,2	31,5	31,0			
miR-7-5p	31,1	27,8	34,1	29,8	29,4	30,5	31,0	31,8	31,6			
	31,0	28,1	35,2				31,1	31,8	31,5			
	26,0	23,5	27,8				30,2	30,1	30,5	27,0	26,4	26,7
	26,3	24,1	29,6				30,5	30,6	30,5	27,3	26,8	27,5
	25,8	22,8	27,6				30,5	30,	30,8	26,2	27,0	26,1
miR-205-5p	26,8	23,7	29,2	26,2	25,7	26,2	26,6	27,8	26,6			
	26,1	23,2	28,9				26,2	23,1	23,0			
	26,4	23,8	30,7				26,8	26,6	25,3	24,2	23,7	23,3
	23,0	21,0	24,4				27,7	26,8	24,6	22,5	22,7	24,2
	23,2	21,3	26,0				27,7	26,8	25,0	24,6	22,7	24,2
miR-342-3p	23,9	19,7	25,0	26,0	25,0	26,3	25,0	22,2	23,0			
	24,2	20,1	26,8				23,4	22,9	23,6			
	23,9	20,7	26,3				22,5	22,7	22,5			
	24,1	21,1	28,0				22,5	22,7	22,5			
	22,8	20,1	24,3				23,3	22,9	23,6			
miR-431-5p	23,3	20,7	25,8	26,0	25,7	26,0	23,3	23,3	23,0			
	22,5	19,4	24,5				23,1	22,6	23,1			
	23,3	20,0	26,1				23,3	22,6	23,0			
	22,8	19,9	25,5				23,3	22,6	23,1			
	23,2	20,4	26,9				23,7	23,2	23,5			
miR-338-5p	29,3	26,0	30,9	31,1	32,4	33,8	30,2	29,4	30,7			
	29,3	26,3	33,0				30,5	29,6	30,9			
	28,7	25,2	30,5				30,0	29,7	29,9			
	29,4	25,6	33,1				30,0	30,1	30,2			
	29,2	25,8	32,0				30,9	29,9	30,4			
miR-125b-2-3p	29,3	26,1	33,5	31,5	31,8	34,2	31,1	29,9	30,7			
	35,7	31,4	35,4				33,9	31,6	33,7			
	35,0	31,4	35,0				33,7	32,1	34,6			
	32,8	30,2	34,0				31,7	33,1	33,9			
	33,9	30,8	34,9				32,2	33,8	34,2			
miR-20a-5p	34,9	31,4	32,4	38,1	34,1	36,2	35,1	33,1	34,8			
	34,9	31,2	35,3				35,6	34,9	36,2			
	28,	25,2	29,4				31,2	31,	31,8	27,3	26,7	27,5
	28,2	25,8	30,9							27,6	27,1	27,8
	27,9	24,6	29,1							26,9	27,8	27,0
28,3	25,1	30,5	27,2	28,2	27,3							
28,	25,0	30,1	27,1	27,9	27,2							
miR-488-5p	28,3	25,8	31,7	31,4	31,2	31,6	27,8	28,2	27,6			
	18,4	15,5	19,8				22,4	21,3	23,0	18,2	17,6	18,5
	18,9	16,1	21,4							18,9	18,1	19,1
	18,4	14,9	19,9							17,8	18,3	17,9
	19,2	15,7	21,7							18,3	18,9	18,3
18,6	15,4	21,1	18,3	18,2	18,5							
miR-488-5p	19,0	15,9	22,7	23,0	22,3	22,9	18,8	18,6	18,8			
	32,8	30,5	34,6				37,9	36,2	37,9	32,1	31,0	32,8
	33,5	31,2	35,1							32,0	31,5	33,5
	31,6	29,9	34,2							32,3	33,1	31,1
	32,7	30,7	34,9							33,1	33,7	31,5
32,7	30,7	34,5	39,9	38,0	36,2	31,9				32,4	32,8	
32,8	31,2	34,7				32,9	33,1	33,2				

miR-155-5p	21,1	18,4	22,9				22,1	21,1	22,1
	21,1	18,5	24,1	25,0	24,1	25,1	22,1	21,1	22,1
	21,0	17,7	22,7	25,0	24,2		21,4	21,7	21,6
	21,3	17,9	24,1	25,1	24,5	22,8	21,5	21,8	21,7
	21,0	18,2	24,2		24,4	25,3	22,0	21,9	22,1
miR-374b-5p	21,5	18,7	23,1				21,4	21,0	21,6
	21,6	18,8	24,5	25,9	25,1	25,9	21,4	21,1	21,8
	21,4	18,0	22,9	26,0	25,1	26,2	21,0	21,5	21,0
	21,7	18,5	24,2	26,3	25,8	23,8	21,0	21,6	21,0
	21,5	18,2	24,3		25,7		21,4	21,7	21,5
miR-216a-5p	31,7	27,0	30,2				32,1	30,7	32,0
	31,2	27,1	32,9	33,1	32,0	35,1	31,6	30,9	31,8
	31,5	26,0	30,6	35,1	32,4	33,9	31,2	30,9	31,5
	31,4	26,5	34,0	34,0	34,6	37,1	31,2	31,8	31,4
	32,1	26,9	33,0		31,9		32,1	31,3	31,9
miR-411-5p	31,6	27,1	34,7				32,3	31,3	31,8
	31,2	27,5	32,5				31,3	29,4	31,9
	31,5	27,9	33,6	34,7	31,8	35,2	31,7	29,6	32,2
	32,0	26,7	32,5	34,3	32,3	35,1	31,4	29,7	31,2
	31,8	27,1	33,7	35,8	33,4	33,0	31,7	30,0	30,8
miR-10b-5p	31,8	27,1	33,9				31,4	30,0	31,5
	31,8	27,4	34,9				31,8	30,3	32,0
	20,2	17,5	21,4				19,9	19,8	20,0
	20,5	18,0	23,1	23,9	23,2	23,8	20,3	20,3	20,5
	20,3	16,7	21,9	23,9	23,7	23,5	19,6	20,5	19,4
miR-125b-1-3p	21,0	17,3	23,4	24,3	24,1	23,9	19,9	20,9	19,8
	20,5	17,6	23,1		23,8		20,2	20,4	20,2
	20,8	18,0	24,2				20,8	20,9	20,6
	32,	28,9	34,1				32,7	32,0	32,8
	31,8	29,2	35,5	32,8	34,9	34,1	32,6	32,2	32,9
miR-342-5p	31,7	28,1	33,3	32,9	35,1	35,2	31,9	31,3	32,2
	32,2	28,7	34,7	33,5	33,6	34,3	32,2	31,5	32,3
	32,5	29,1	32,6		33,3		32,3	32,4	31,7
	32,5	29,4	34,6				33,	32,2	32,6
	27,3	24,9	29,2				28,1	27,1	28,2
let-7f-2-3p	27,4	25,2	30,8	31,4	30,4	31,3	28,2	27,4	28,4
	27,3	24,4	29,2	31,3	30,7	31,3	27,5	28,0	27,6
	27,6	24,6	30,6	31,6	30,9	31,6	27,6	28,1	27,6
	27,4	24,9	30,8		31,		28,	28,0	27,9
	27,6	25,	31,9				28,3	28,1	28,1
miR-28-5p	25,6	22,6	27,4				24,6	24,0	25,0
	25,6	23,0	28,9	30,6	29,7	30,5	24,9	24,2	25,2
	25,3	21,9	27,1	31,0	30,2	30,7	24,0	24,8	24,0
	25,9	22,3	28,4	31,1	30,3	30,8	24,1	25,2	24,2
	25,7	22,4	28,8		30,6		24,7	24,9	24,8
miR-212-3p	25,8	22,7	30,1				25,0	25,2	25,0
	22,3	19,7	23,9				22,2	21,7	22,6
	22,2	19,7	25,2	26,4	25,5	26,1	22,3	21,7	22,7
	22,4	18,8	24,0	26,8	25,6	24,2	22,0	22,2	22,0
	22,8	18,9	25,6	27,1	26,2	26,7	22,0	22,3	21,9
miR-874-3p	22,6	19,1	25,1				22,4	22,2	22,5
	22,5	19,2	26,2				22,5	22,1	22,5
	29,0	26,8	30,6				29,4	28,9	29,8
	29,2	26,7	32,2	32,8	31,8	32,5	29,6	29,0	30,0
	29,0	25,9	30,7	33,0	31,8	32,9	29,1	29,0	28,9
miR-19b-3p	29,3	26,2	32,3	32,6	32,2	32,8	29,2	29,4	29,2
	29,3	26,0	31,6		32,5		29,6	29,4	29,3
	29,0	26,1	32,8				29,9	29,2	29,7
	23,6	20,9	25,7				24,5	23,9	24,6
	23,9	21,2	27,4	27,7	26,9	27,9	24,9	24,2	25,0
miR-34c-5p	23,7	20,5	25,6	27,5	27,2	27,3	24,0	24,7	24,0
	24,1	21,0	27,2	27,7	27,4	27,6	24,3	25,2	24,3
	23,9	20,8	26,8		27,4		24,3	25,0	24,3
	24,0	21,0	28,3				25,0	25,2	24,7
	17,9	15,3	19,6				17,8	17,0	17,8
miR-19b-3p	18,2	15,9	21,3	22,4	21,8	22,5	18,2	17,6	18,3
	17,7	14,5	19,1	22,6	22,2	22,4	17,2	17,5	17,3
	18,5	15,1	20,8	22,9	22,8	22,3	17,7	18,2	17,9
	18,0	14,8	20,6		22,2		17,8	17,7	17,5
	18,4	15,5	22,1				18,4	18,4	18,3
miR-34c-5p	30,4	28,3	32,5				31,2	30,9	31,8
	30,5	28,2	34,0	35,2	34,6	35,0	31,4	30,9	31,8
	30,7	27,4	32,6	35,8	34,9	34,2	31,0	31,6	31,2
	31,2	27,5	33,3	35,5	34,8	34,4	30,9	31,8	31,2
	31,1	28,1	33,7		35,4		31,4	31,6	31,7

	30,9	28,2	35,0				31,6	31,6	31,7
	25,9	23,1	27,6				25,3	24,9	25,5
	25,9	23,2	28,9				25,3	24,9	25,6
	25,6	22,2	27,1	31,6	30,7	31,2	24,8	25,4	24,8
	25,9	22,5	28,3	31,6	30,9	31,4	24,8	25,4	24,9
	25,8	22,9	29,5	31,8	31,5	31,4	25,2	25,6	25,2
	25,8	22,9	30,1		30,9		25,4	25,6	25,3
	20,2	17,4	21,8				20,3	19,3	20,4
	20,1	17,5	22,9				20,3	19,8	20,5
	20,0	16,9	21,6	23,8	22,9	23,6	19,7	20,2	19,8
	20,3	17,0	22,9	23,8	23,0	23,7	19,8	20,3	19,8
	20,2	17,0	22,8	24,1	23,3	23,8	20,1	20,3	20,2
	20,1	17,1	23,9		23,2		20,2	20,2	20,2
	30,8	26,8	32,8				30,9	29,1	31,0
	30,9	27,1	33,9				31,2	29,4	31,2
	30,6	26,0	31,7	34,2	32,7	34,9	30,5	29,9	30,9
	30,7	26,5	32,7	35,4	32,5	33,3	30,8	30,3	30,9
	31,0	27,0	34,0	34,4	33,9	32,9	31,2	29,8	31,4
	30,9	27,2	34,9		32,8		31,7	30,0	31,5
	19,6	16,8	21,2				19,8	18,9	19,6
	20,1	17,4	22,9				20,2	19,4	20,1
	19,5	16,0	21,3	23,3	22,6	23,6	19,2	19,5	19,2
	20,3	16,6	23,1	23,4	23,0	23,6	19,7	20,1	19,8
	19,9	16,5	22,5	23,7	23,5	21,9	19,6	19,7	19,6
	20,3	17,1	24,1		23,3		20,2	20,1	20,2
	26,0	23,3	27,5				26,2	25,4	26,3
	26,7	24,2	29,4				26,9	26,2	27,1
	26,2	22,6	27,6	29,6	28,7	29,9	25,6	26,2	25,7
	27,2	23,4	29,6	30,1	29,5	29,3	26,3	27,0	26,5
	26,2	23,3	28,6	30,2	30,1	29,8	26,2	26,1	26,3
	27,0	24,1	30,4		30,1		27,1	26,9	27,0
	30,4	27,1	31,9				31,3	29,7	31,4
	30,3	27,1	33,0				31,3	29,7	31,3
	30,4	26,1	32,4	34,1	32,7	34,0	31,0	30,4	31,0
	30,7	26,3	33,4	34,6	32,8	35,0	30,9	30,2	31,2
	31,1	27,1	32,0	34,3	33,1	32,9	31,6	30,1	31,7
	30,4	27,2	33,6		33,5		31,5	30,0	31,8
	23,4	20,6	25,0				23,2	23,2	23,1
	23,5	20,8	26,1				23,5	23,0	23,3
	23,1	20,0	24,7	27,1	26,3	27,3	22,6	23,2	22,5
	23,7	20,4	26,0	27,1	26,6	27,0	22,6	23,3	22,6
	23,1	20,3	25,8	27,3	26,9	27,0	22,9	23,7	23,1
	23,2	20,5	27,1		26,7		23,1	24,6	23,3
	27,1	24,6	28,7				27,2	26,7	27,4
	27,2	24,9	30,0				27,6	27,0	27,7
	27,0	23,7	28,2	29,9	29,4	30,2	26,8	27,2	26,9
	27,5	24,4	29,9	30,4	29,7	30,3	26,9	27,5	27,1
	27,1	24,1	29,7	30,0	29,9	30,2	27,3	27,1	27,3
	27,7	24,3	30,7		29,6		27,6	27,2	27,5
	31,7	25,4	33,8				32,2	27,2	32,5
	32,1	25,6	33,7				33,0	27,4	33,1
	31,3	24,0	33,6	34,1	29,8	34,6	32,0	28,1	31,7
	31,9	24,3	35,3	34,3	30,0	34,0	31,9	28,1	32,3
	31,9	25,3	33,0	34,5	30,9	32,8	31,9	27,1	31,8
	32,1	25,6	33,9		31,0		32,7	27,1	32,2
	18,8	15,9	20,0				18,8	17,9	18,8
	19,2	16,4	21,5				19,3	18,3	19,1
	18,5	15,3	20,1	22,3	21,7	22,5	18,0	18,5	18,0
	19,2	16,0	21,8	22,4	22,2	21,9	18,5	18,9	18,4
	18,8	15,6	21,1	22,7	22,4	22,2	18,6	18,8	18,5
	19,1	16,2	22,8		22,2		19,3	19,2	18,7
	25,2	22,6	27,1				25,7	25,1	25,9
	26,0	23,4	29,1				26,5	25,9	26,8
	25,0	22,0	26,7	29,9	29,2	30,6	25,4	25,7	25,4
	26,2	22,9	29,1	30,0	30,2	30,3	26,1	26,7	26,3
	25,4	22,3	28,4	30,4	30,5	30,3	25,9	25,7	26,0
	26,3	23,2	30,2		30,1		26,8	26,4	26,7
	30,5	28,1	31,4				30,9	30,3	31,0
	30,6	28,0	32,5				30,7	30,1	31,2
	30,8	27,2	32,4	32,9	32,2	33,3	30,8	31,3	30,6
	31,2	27,5	34,2	34,6	32,1	34,1	30,6	31,3	30,3
	30,5	27,9	31,2	35,3	34,1	35,1	31,1	31,1	31,2
	30,7	27,8	33,2		33,1		31,2	31,2	31,1
	27,8	24,0	29,9				29,1	28,8	29,0
	27,8	24,2	31,9	31,9	31,0	34,0	29,4	28,8	29,5
	27,6	23,2	29,7	32,4	30,9	32,0	28,9	28,8	28,9
	27,9	23,8	31,9	32,6	31,4	31,9	29,1	29,1	29,0

	28,0 27,9	24,2 24,3	31,3 32,4				30,0 30,1	28,9 29,1	29,3 29,7
miR-16-5p	17,8 17,8 17,8 18,2 17,9 17,9	15,0 15,2 14,3 14,5 14,9 15,0	19,3 20,5 19,1 20,5 20,2 21,4	21,4 21,5 21,9	20,9 21,1 21,3 21,4	21,3 20,3 21,5	17,8 18,1 17,1 17,3 17,8 17,9	17,1 17,3 17,9 18,2 18,0 18,2	18,0 18,2 17,1 17,1 17,9 18,0
let-7d-5p	20,3 20,4 20,3 20,7 20,6 20,5	17,6 17,9 17,0 17,3 17,2 17,5	21,5 23,1 21,8 23,3 22,6 24,0	23,8 23,8 24,0	22,8 23,1 23,4 23,3	24,1 23,8 24,0	20,1 20,4 19,5 19,7 19,8 20,3	19,4 19,6 19,8 20,1 19,9 20,1	20,0 20,1 19,6 19,8 19,9 20,2
miR-376b-3p	31,6 32,3 31,8 32,3 31,8 32,1	26,5 27,2 25,8 26,4 26,3 27,0	33,8 35,1 32,6 35,4 32,9 34,8	34,0 34,5 33,7	32,8 34,1 32,9 31,7	35,0 34,0 35,8	31,3 31,5 31,6 32,4 31,4 32,2	28,7 29,2 29,1 29,7 29,4 29,8	31,3 32,0 32,2 32,7 31,3 31,7
miR-130a-3p	20,4 20,9 20,3 21,1 20,4 20,9	17,6 18,3 17,1 17,8 17,6 18,2	21,9 23,9 22,0 23,8 23,1 25,2	24,3 24,5 24,8	23,4 24,3 24,7 24,5	25,1 22,6 24,9	20,3 20,7 19,6 20,2 20,4 21,0	19,7 20,4 20,5 21,2 20,5 21,0	20,8 21,3 19,8 20,4 20,3 21,1
miR-26b-5p	21,7 21,9 21,5 22,1 21,7 21,8	18,9 19,1 18,1 18,6 18,5 18,7	23,8 24,9 23,2 24,7 24,7 26,0	26,0 26,3 26,4	25,2 25,6 26,0 25,8	26,4 26,5 24,5	21,3 21,5 20,9 21,0 21,3 21,6	21,0 21,2 21,4 21,7 21,7 21,9	21,4 21,7 21,0 21,2 21,4 21,6
miR-34b-5p	31,1 31,3 31,2 31,2 31,6	28,7 28,6 27,5 28,1 28,2 28,3	32,9 34,5 31,8 33,4 34,6 35,5	34,6 34,3 34,0	32,9 33,7 32,6 33,1	35,3 34,0 33,4	31,5 31,3 30,9 31,0 31,5 31,6	31,1 30,9 31,7 31,9 31,6 31,8	31,4 31,7 31,1 31,1 31,6 32,0
miR-708-5p	20,9 21,0 20,7 21,3 20,9 21,0	18,3 18,8 17,6 18,0 17,9 18,2	22,3 23,8 22,3 23,8 23,6 25,1	25,1 25,1 25,3	24,3 24,6 25,0 24,7	25,2 25,3 22,9	20,9 21,2 20,1 20,7 20,7 21,1	20,2 20,5 20,8 21,1 21,1 21,3	20,9 21,2 20,0 20,3 20,7 20,9
miR-598-3p	26,1 26,1 26,1 26,7 26,2 26,2	23,6 23,9 22,8 23,1 23,4 23,5	27,7 29,0 27,4 29,0 29,0 30,5	30,4 30,3 31,3	29,8 30,2 30,4 30,5	30,1 30,4 30,9	25,9 26,1 25,5 25,7 25,9 26,2	25,5 25,8 26,1 26,5 25,9 26,1	26,1 26,3 25,5 25,7 26,0 26,3
let-7e-5p	19,9 20,3 20, 20,6 20,2 20,3	17,1 17,7 16,6 17,2 17,0 17,6	21,9 23,4 21,6 23,1 22,9 24,3	23,8 23,8 24,1	22,8 23,0 23,3 23,3	24,2 23,9 24,1	19,6 20,1 19,2 19,6 19,8 20,3	19,3 19,6 19,7 20,2 19,9 20,3	20,0 20,5 19,5 19,8 19,9 20,4
miR-191-5p	20,8 20,8 20,8 21,1 20,9 20,9	18,2 18,2 17,2 17,5 17,9 17,9	22,2 23,5 22,3 23,5 23,2 24,3	24,1 24,1 24,3	23,1 23,4 23,6 23,7	24,0 21,9 21,8	20,9 20,9 20,1 20,2 21,1 20,9	20,1 20,2 20,9 21,0 21,1 21,1	21,0 21,1 20,3 20,4 20,9 21,0
miR-10a-5p	22,0 22,2 21,9 22,8 22,1 22,3	19,2 19,6 18,3 18,8 18,8 19,1	23,6 25,2 23,9 25,4 25,0 26,6	26,0 25,9 26,3	25,0 25,4 26,0 25,8	25,9 25,7 25,9	21,9 22,0 21,3 21,3 21,6 21,9	21,0 21,3 21,8 22,1 22,0 22,3	22,0 22,4 21,0 21,3 21,6 21,7
miR-503-5p	26,8 26,9 26,4 26,7 26,9 26,9	24,2 24,4 23,8 24,3 24,2 24,3	28,7 29,9 28,9 30,0 29,6 31,2	31,1 31,5 31,8	30,8 31,1 31,4 31,4	31,3 31,6 31,7	27,1 27,1 26,8 26,8 27,4 27,5	27,8 27,8 28,1 28,2 28,2 28,2	26,8 27,0 26,5 26,5 26,9 27,2
miR-154-3p	33,1 34,1 33,8	28,6 29,0 27,7	32,6 33,8 33,9	34,7 / 34,7	34,8 35,4 34,9	34,5 / /	35,6 34,7 34,4	31,0 31,2 31,6	34,6 35,7 34,5

	34,3 33,8 35,6	28,4 28,2 28,7	34,5 34,2 35,0	33,1			34,3 35,7 35,5	32,1 31,6 32,3	34,4 33,9 33,1
miR-497-5p	26,6 26,9 26,2 26,8 26,5 26,8	23,6 24,0 22,8 23,3 23,2 23,6	27,9 29,8 28,0 29,5 29,1 30,9	31,0 31,2 31,1	29,9 30,5 31,1 30,8	31,2 31,3 31,3	26,5 26,7 25,8 26,2 26,2 26,5	25,7 26,0 26,2 26,8 26,5 26,8	26,4 26,8 25,8 26,0 25,9 26,4
miR-34c-3p	24,5 24,2 24,7 24,1 24,7 24,1	22,6 22,1 21,9 21,8 22,7 22,2	26,8 27,5 26,6 27,3 27,2 28,2	28,8 29,7 29,3	29,5 29,1 29,1 29,7	28,0 28,9 29,2	27,1 26,4 26,3 25,9 27,1 26,8	26,7 26,1 27,1 26,8 26,7 26,3	26,9 26,6 26,5 25,9 27,1 26,8
miR-93-5p	20,2 20,2 19,9 20,3 20,3 20,2	17,6 17,6 16,8 17,0 17,3 17,3	21,6 22,8 21,6 22,8 22,8 23,9	23,7 23,6 24,0	22,8 22,9 23,2 23,1	23,6 23,8 23,6	20,2 20,3 19,7 19,7 20,6 20,4	19,5 19,6 20,1 20,2 20,3 20,2	20,2 20,3 19,7 19,7 20,3 20,3
miR-19a-3p	17,9 18,0 17,7 18,3 18,1 18,3	15,2 15,5 14,4 15,1 14,9 15,3	19,7 21,1 19,1 20,7 20,9 22,2	22,8 22,9 23,1	21,6 22,1 22,7 22,6	22,9 22,8 22,0	17,7 18,0 17,1 17,4 17,8 18,0	16,9 17,2 17,6 17,9 17,6 18,1	17,9 18,3 17,1 17,4 17,9 18,1
miR-92a-3p	18,4 18,6 18,1 19,1 18,4 18,6	15,7 16,2 15,2 15,7 15,6 16,0	20,0 21,4 20,1 21,6 21,1 22,5	21,7 21,8 21,9	20,7 21,1 21,0 21,4	21,9 20,0 21,8	18,4 19,0 18,0 18,3 18,6 19,0	17,8 18,2 18,3 18,8 18,4 18,8	18,8 19,2 18,0 18,3 19,2 19,0
miR-215-5p	23,6 23,9 23,2 24,0 23,5 23,9	21,0 21,4 20,4 21,0 20,8 21,1	25,2 26,7 24,8 26,5 26,0 27,3	27,9 28,1 28,2	27,3 27,6 28,3 27,9	27,9 27,9 27,9	23,9 24,2 23,1 23,4 23,7 24,3	23,2 23,6 23,8 24,3 24,0 24,3	24,0 24,4 23,1 23,4 23,8 24,0
miR-31-5p	19,2 19,4 19,4 20,2 19,6 19,9	16,6 16,9 15,8 16,3 16,2 16,5	20,8 22,3 21,1 22,6 22,1 23,8	23,2 23,5 23,9	22,2 22,9 23,2 23,0	23,7 22,9 23,7	19,2 19,8 18,9 19,2 19,5 19,9	18,5 18,9 19,0 19,5 18,9 19,3	19,6 20,0 19,1 19,3 19,7 20,0
miR-125b-5p	21,4 21,8 21,4 22,3 21,5 21,8	18,7 19,3 18,1 18,9 18,4 18,9	22,7 24,3 22,9 24,5 23,8 25,5	24,7 24,5 25,0	24,2 24,7 24,8 24,6	25,1 24,3 24,7	21,0 21,7 20,4 20,9 21,2 21,7	20,5 21,2 21,2 21,9 21,2 21,8	21,1 21,7 20,5 20,9 21,1 21,7
miR-15b-5p	19,9 20,2 19,9 20,3 20,0 20,1	17,1 17,3 16,9 16,9 17,0 17,1	21,3 22,6 21,3 22,5 22,6 23,8	24,0 24,0 24,2	23,0 23,3 23,7 23,5	23,9 24,0 24,0	20,3 20,0 19,2 19,3 20,4 20,1	19,2 19,5 19,9 20,1 20,1 20,2	20,0 20,3 19,2 19,2 19,9 20,0
miR-17-5p	19,2 19,3 19,4 20,0 19,5 19,7	16,7 17,0 15,8 16,3 16,3 16,6	20,9 22,2 20,8 22,4 22,0 23,4	23,0 23,1 23,5	22,0 22,4 22,7 22,9	23,3 23,4 23,4	19,2 19,5 18,9 19,1 19,2 19,5	18,7 19,0 19,3 19,6 19,2 19,5	19,3 19,7 18,9 19,0 19,4 19,6
miR-299-5p	32,9 32,8 30,8 31,7 32,1 31,8	28,7 28,9 27,4 27,9 28,3 28,5	32,5 33,9 34,6 35,5 35,2 38,2	34,9 34,8 35,7	34,4 34,0 33,2 33,2	33,3 33,9 35,5	33,6 33,7 32,5 32,6 32,0 31,6	30,0 30,3 30,7 31,1 30,9 31,0	33,0 33,3 31,7 31,7 31,9 32,1
miR-31-3p	23,2 23,3 23,0 23,5 23,2 23,3	20,3 20,5 19,6 20,0 20,1 20,3	24,7 26,0 24,6 25,9 25,5 27,0	27,3 27,4 27,8	26,1 26,4 27,0 26,9	27,1 27,2 24,8	22,7 22,9 22,2 22,3 22,7 23,1	21,9 22,1 22,5 22,8 22,5 22,6	23,0 23,2 22,1 22,3 22,9 23,1
let-7f-5p	19,4 20,1	16,3 17,2	20,9 23,3	23,7 23,9	22,8 23,6	24,5 21,9	19,3 19,9	18,3 19,0	19,5 20,1

	19,2 20,1 19,6 20,2	15,5 16,3 16,2 16,9	21,1 23,1 22,7 24,3	24,1	23,9 23,7	24,8	18,6 19,1 19,1 19,8	19,3 19,9 19,3 19,9	18,5 19,1 19,2 19,9
miR-122-5p	30,8 31,2 30,8 31,7 30,7 31,5	28,4 28,8 27,5 28,1 28,3 28,5	31,9 33,3 32,0 34,0 33,2 33,9	33,7 34,3 35,4	33,3 33,8 34,1 34,9	34,1 32,8 35,3	31,6 32,0 31,1 31,7 31,6 31,8	30,8 31,3 31,4 32,3 31,6 32,2	31,1 32,0 31,0 31,1 31,6 31,8
miR-27a-3p	19,3 19,4 19,3 19,9 19,4 19,6	16,2 16,5 15,5 15,9 16,1 16,3	21,0 22,4 20,8 22,0 22,2 23,6	23,8 24,1 24,3	22,7 23,0 23,6 23,2	23,9 23,8 24,1	18,9 19,2 18,6 18,7 19,1 19,5	17,8 18,1 18,6 19,0 18,7 18,9	19,0 19,3 18,7 18,9 19,1 19,4
miR-224-5p	32,0 31,8 31,6 32,2 31,7 31,7	28,7 29,1 28,1 28,6 28,3 28,6	34,0 35,5 33,8 35,7 31,1 34,8	34,0 34,9 35,3	35,2 35,1 33,1 34,6	34,1 35,0 33,4	33,8 34,1 32,9 32,9 31,9 32,5	31,7 32,1 32,0 32,1 32,2 32,3	34,5 34,4 32,9 32,7 32,1 31,9
miR-484	23,4 23,4 23,3 23,8 23,5 23,5	21,1 21,4 20,4 20,7 21,0 21,1	25,1 26,5 25,2 26,6 26,2 27,2	27,1 27,3 27,5	26,7 27,0 27,3 27,1	27,1 27,1 25,2	23,8 23,9 23,3 23,3 23,8 24,0	22,9 23,2 23,8 24,0 23,8 23,9	23,8 24,0 23,0 23,1 23,8 24,0
miR-504-5p	31,9 32,2 31,8 32,1 31,9 32,3	28,9 29,4 28,1 28,9 28,9 29,4	32,0 33,9 31,4 34,4 33,1 34,1	35,4 34,0 32,5	35,0 35,5 36,3 33,9	36,0 35,1 35,9	33,2 33,9 32,7 33,6 34,1 34,9	32,2 32,1 32,2 33,1 33,1 33,5	33,3 33,3 31,1 31,9 34,0 35,4
let-7b-5p	19,9 20,2 19,4 20,2 19,8 20,2	17,1 17,6 16,6 17,5 17,0 17,8	20,6 22,1 20,8 22,2 21,6 23,1	22,3 22,5 22,8	21,3 22,0 22,1 22,1	22,2 22,0 22,3	19,2 19,8 18,6 19,1 19,2 19,9	18,8 19,4 19,2 19,9 19,2 19,7	19,5 20,1 19,0 19,4 19,4 20,2
miR-98-5p	23,6 24,3 23,1 24,1 23,5 24,1	20,4 21,3 19,9 20,8 20,3 21,0	25,2 27,2 25,1 27,0 26,4 28,3	27,6 27,7 28,1	26,9 27,8 27,9 27,9	28,3 28,1 28,4	23,1 23,9 22,6 23,2 23,0 23,7	22,5 23,3 23,1 24,0 23,2 24,1	23,4 24,2 22,7 23,4 23,2 23,9
miR-34b-3p	32,4 32,0 31,4 32,3 31,8 31,7	28,6 28,8 27,8 28,3 28,7 28,9	32,7 34,6 30,9 34,2 33,5 34,1	33,4 34,3 35,6	33,9 34,6 33,5 32,6	34,6 34,1 34,2	32,1 32,6 31,2 31,5 33,0 33,0	32,5 32,6 32,5 32,9 32,8 32,7	31,9 31,8 31,5 31,3 31,3 31,9
miR-500a-3p	26,1 26,1 25,7 26,2 26,1 26,2	23,4 23,5 22,9 23,2 23,3 23,5	27,5 28,8 27,3 28,5 28,3 29,7	29,6 29,6 29,7	28,7 29,0 29,3 28,9	29,3 29,2 29,4	26,1 26,2 25,4 25,5 26,0 26,2	25,4 25,7 25,9 26,0 26,0 26,2	26,1 26,1 25,5 25,6 26,1 26,3
miR-181c-5p	25,8 26,0 25,8 26,1 26,3 26,3	23,1 23,3 22,0 22,4 23,0 23,2	27,2 28,8 27,8 29,1 28,6 30,0	29,9 30,8 31,2	29,2 29,7 30,0 30,0	29,8 30,4 30,9	25,9 25,9 25,3 25,4 25,9 26,1	25,3 25,4 25,8 26,1 25,6 25,6	26,1 26,3 25,6 25,7 26,1 26,4
miR-208a-3p	36,1 35,4 34,3 34,9 34,9 35,1	32,4 32,7 32,0 32,7 32,6 33,4	37,4 38,4 36,8 37,0 37,4 /	38,2 39,3 36,8	38,4 37,3 35,4 38,5	39,1 39,1 39,7	37,3 / 34,5 36,4 / 37,8	34,5 35,5 37,7 36,1 36,8 37,2	37,8 37,8 38,1 36,7 40,0 37,5
miR-124-3p	32,3 32,1 31,2 31,8 31,8 30,6	28,5 29,1 28,3 28,7 28,8 29,1	34,3 34,8 31,5 33,0 33,5 34,9	34,7 34,1 34,5	34,6 35,1 31,7 35,7	35,0 33,2 33,4	32,9 33,1 32,1 32,1 31,8 31,3	31,0 31,2 31,8 31,9 32,0 32,1	32,4 33,1 31,7 32,1 32,7 33,0
miR-125a-5p	19,0	16,3	20,4	22,5	21,4	22,8	19,0	18,0	19,1

	19,4 19,0 19,9 19,3 19,8	17,0 15,7 16,4 16,3 16,8	21,9 20,6 22,2 21,7 23,2	22,2 22,8	21,9 22,0 22,2	22,1 22,4	19,5 18,7 19,1 19,1 19,7	18,6 18,9 19,4 18,9 19,6	19,8 18,5 19,1 19,0 19,5
miR-29c-3p	19,5 19,6 19,2 19,7 19,6 19,7	16,2 16,4 15,5 16,0 16,1 16,3	20,9 22,5 20,8 22,1 22,0 23,6	23,9 24,2 24,5	23,2 23,8 24,1 23,9	23,8 24,1 24,1	18,9 19,0 18,1 18,3 19,0 19,3	18,2 18,4 18,8 19,2 19,1 19,3	19,0 19,3 18,4 18,4 18,9 19,2
miR-23a-3p	18,6 18,6 18,7 19,0 18,9 18,9	15,8 15,8 14,9 15,2 15,3 15,4	20,1 21,4 20,2 21,4 21,2 22,4	22,3 22,5 22,8	21,1 21,2 21,7 21,5	22,1 22,0 22,4	18,6 19,0 18,3 18,3 18,6 19,1	17,6 17,7 18,1 18,3 18,3 18,3	19,0 19,0 18,2 18,2 19,0 19,0
let-7c-5p	19,0 19,4 19,0 19,5 19,2 19,3	16,2 16,4 15,3 15,9 15,8 16,1	20,3 21,8 20,4 21,9 21,9 23,1	22,7 22,7 23,0	21,7 22,2 22,3 22,2	22,9 22,7 22,8	18,6 18,8 18,1 18,2 18,4 18,7	18,0 18,3 18,6 18,9 18,6 18,9	18,7 18,7 17,9 18,1 18,6 18,9
miR-216b-5p	32,1 31,9 31,4 32,1 32,3 32,1	27,9 28,4 27,1 27,8 28,1 28,5	30,6 33,9 31,7 34,9 34,9 37,5	34,9 34,2 38,1	34,6 34,8 33,9 34,4	33,9 35,6 37,1	31,1 30,9 30,4 30,4 31,6 31,6	30,4 30,2 30,9 31,2 30,8 30,8	31,2 31,5 30,8 30,5 31,2 31,5
miR-106b-5p	19,9 20,4 19,8 20,6 19,9 20,4	17,2 17,8 16,4 17,2 16,9 17,6	21,4 23,3 21,1 23,0 22,8 24,4	24,4 24,5 24,8	23,5 24,5 24,7 24,3	24,9 22,6 24,6	19,8 20,3 19,2 19,7 19,7 20,3	19,0 19,6 19,6 20,3 19,8 20,4	19,9 20,6 19,2 19,8 19,6 20,3
miR-139-5p	27,4 28,1 27,2 28,5 26,9 27,7	24,5 25,5 24,0 25,0 24,1 25,1	29,2 31,2 29,1 31,1 29,7 31,8	30,4 31,3 31,4	30,5 31,6 31,5 31,3	31,9 31,2 31,2	28,1 28,9 27,3 28,2 27,9 28,7	27,2 28,1 27,8 28,9 28,0 28,8	28,2 29,1 27,2 28,3 27,9 28,8
miR-450a-5p	25,2 25,3 25,0 25,3 25,2 25,2	22,6 22,7 21,9 22,3 22,1 22,3	26,8 28,2 26,9 28,1 28,0 29,4	30,1 30,1 30,2	29,0 29,4 29,9 29,5	30,0 30,3 30,3	25,1 25,3 24,3 24,2 25,0 25,2	24,6 24,8 25,2 25,4 25,3 25,3	25,1 25,4 24,3 24,4 25,1 25,2
miR-23a-5p	31,0 31,2 30,9 31,5 31,3 31,2	27,8 28,1 26,8 27,3 27,9 28,1	32,0 33,5 32,2 34,6 32,6 33,3	34,8 34,2 34,1	33,3 33,7 34,8 33,6	34,0 34,1 34,9	30,2 30,1 30,1 30,1 30,6 30,9	29,2 29,2 30,0 30,4 30,1 29,6	31,1 31,1 30,3 30,1 30,4 31,2
let-7a-5p	18,0 18,1 18,0 18,4 18,2 18,3	15,1 15,1 14,3 14,7 14,7 15,1	19,3 20,6 19,3 20,7 20,7 21,8	21,4 21,5 21,8	20,3 20,7 21,0 20,9	21,4 21,6 20,9	17,5 17,7 16,9 17,0 17,4 17,7	16,9 17,0 17,8 17,6 17,7	17,7 17,9 17,0 17,1 17,6 17,8
miR-188-5p	27,1 27,3 26,7 27,2 27,1 27,2	24,7 25,2 24,4 24,9 24,4 24,6	28,5 30,1 28,7 30,0 29,8 31,5	31,4 32,0 31,9	31,2 31,4 31,7 31,6	31,6 31,8 32,0	27,2 27,4 26,9 27,0 27,2 27,6	27,0 27,2 27,6 28,0 27,5 28,0	27,6 28,0 27,0 27,2 27,1 27,7
miR-424-5p	22,2 22,6 22,0 22,9 22,3 22,8	19,3 20,0 18,7 19,4 19,3 20,0	24,0 26,0 23,7 25,6 25,4 27,2	27,0 27,3 27,7	26,4 27,2 27,5 27,3	27,4 27,6 27,7	21,4 22,1 21,1 21,6 21,6 22,5	21,1 21,8 21,8 22,6 21,8 22,4	21,8 22,6 21,1 21,9 21,8 22,3
miR-130b-3p	22,8 23,4 22,6 23,5 23,1 23,4	20,3 21,0 19,4 20,1 20,2 20,9	24,3 26,1 24,5 26,3 25,7 27,5	26,6 26,9 27,1	25,7 26,5 26,9 26,8	27,3 27,3 27,3	23,0 23,5 22,7 23,1 23,3 23,9	22,7 23,1 23,2 23,9 23,1 23,7	23,6 24,0 22,7 23,4 23,0 23,9

miR-532-3p	25,7	23,2	27,1	29,1	28,4	28,8	25,7	25,0	25,9
	25,9	23,2	28,2				25,8	25,2	25,9
	25,1	22,4	27,2				25,1	25,8	25,1
	25,5	22,6	28,4				25,1	25,9	25,1
	25,7	22,9	28,3				25,7	26,0	25,7
miR-30d-5p	25,5	22,9	29,3	29,4	28,8	29,0	25,8	25,9	25,8
	18,7	16,2	20,8	23,1	22,6	22,8	19,1	19,0	19,2
	19,2	16,6	22,2				19,4	19,3	19,5
	18,5	15,6	20,8				18,8	19,5	18,8
	19,0	16,1	22,3				19,0	19,8	19,1
18,6	16,1	22,1	19,2				19,8	19,3	
miR-190b	18,7	16,3	23,3	23,8	23,4	23,1	19,8	19,8	19,5
	28,4	26,2	30,3	31,0	31,8	31,6	28,9	28,1	29,0
	29,1	26,1	32,2				29,4	28,9	29,3
	28,3	25,1	29,9				28,3	28,5	28,3
	29,1	26,0	31,5				28,8	29,1	28,7
28,2	25,3	30,8	28,8				28,7	28,9	
miR-935	28,6	25,8	32,6	32,3	32,4	32,5	29,3	29,8	29,2
	25,8	23,2	27,4	29,5	28,9	30,0	26,1	25,2	26,0
	26,3	23,9	29,2				27,0	25,8	26,6
	26,2	22,6	27,4				25,5	25,5	25,6
	27,0	23,7	29,4				26,1	26,0	26,2
25,6	23,1	28,8	26,1				26,0	26,1	
miR-132-3p	26,2	23,8	30,2	29,7	29,5	29,7	26,8	26,5	27,0
	24,7	22,1	26,8	28,9	27,9	28,8	25,1	24,6	25,3
	25,0	22,6	28,1				25,5	25,0	25,9
	24,4	21,5	26,6				24,9	25,2	24,8
	25,0	22,1	28,1				25,2	25,7	25,3
24,5	21,9	27,6	25,2				25,3	25,3	
miR-29b-2-5p	24,9	22,5	29,0	29,2	28,4	28,7	25,7	25,7	25,7
	26,9	24,3	29,1	30,5	30,5	31,8	27,2	26,9	27,3
	27,3	25,1	31,2				27,8	27,8	28,1
	26,3	23,9	28,8				26,6	27,5	26,7
	27,2	24,5	28,8				27,2	28,2	27,4
26,5	24,2	30,9	27,1				27,7	27,2	
cel-miR-39-3p	27,0	24,7	29,6	31,2	31,3	32,1	28,1	28,2	27,9
	17,6	17,9	17,9	18,2	18,7	18,0	21,5	21,2	21,4
	17,9	18,0	17,9				21,5	21,3	21,5
	19,2	19,1	19,1				21,2	20,8	20,9
	19,3	19,1	19,2				21,1	20,9	21,0
18,0	18,0	18,4	21,8				21,1	21,6	
U6	18,0	18,1	18,3	19,2	19,2	18,8	21,8	21,2	21,6
	24,2	19,4	23,3	27,0	25,3	27,7	21,5	21,3	21,1
	24,1	20,3	27,1				21,1	21,5	21,5
	23,5	19,4	24,7				27,5	25,7	28,5
	23,4	19,8	27,1				28,1	25,6	27,4
24,1	18,0	18,4	25,9				25,9	21,7	
UniSp6	24,0	18,1	18,3	28,1	25,9	27,4	21,9	22,0	21,3
	19,0	19,4	19,3	19,2	19,3	19,3	19,4	19,3	19,4
	19,2	19,4	19,2				19,5	19,4	19,5
	19,1	19,2	19,4				19,2	19,1	19,2
	19,4	19,4	19,4				19,4	19,4	19,4
19,3	19,3	19,2	19,3				19,2	19,2	
UniSp3	19,4	19,4	19,2	19,6	19,5	19,4	19,4	19,4	19,3
	19,1	19,4	19,4	19,3	19,3	19,4	19,3	19,3	19,3
	19,3	19,5	19,6				19,5	19,5	19,6
	19,1	19,3	19,3				19,3	19,2	19,4
	19,3	19,5	19,4				19,4	19,4	19,6
19,2	19,2	19,3	19,3				19,3	19,4	
UniSp3	19,5	19,2	19,3	19,5	19,2	19,4	19,2	19,4	19,4

#### Anhang-Tabelle 47: Ergebnisse des miRNA-Profilings in hRPTECs und Zellkulturmedium *in vitro*

Signifikant veränderte miRNAs im Zellkulturmedium und Zellen nach Behandlung von hRPTECs mit HSA (20 mg/ml) oder TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) für 48h (n=3). MiRNAs wurden mittels individualisierter miRCURY LNA qRT-PCR Panels (Qiagen) quantifiziert. EVs wurden aus 80 ml Zellkulturmedium mit Hilfe des *miRCURY Exosome Isolation Kits* (Qiagen) isoliert. MiRNAs im Zellkulturmedium und CCM-EVs wurden nach der modifizierten  $\Delta$ Ct-Methode ohne Normalisierung auf UCrea ausgewertet. Intrazelluläre miRNAs wurden nach der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode einschließlich Normalisierung auf das Referenzgen U6 ausgewertet. Statistische Analyse erfolgte mittels multiplen T-Test ( $p \leq 0,05$ ) einschließlich Korrektur mittels der FDR ( $q \leq 0,05$ ) kombiniert mit einer Effektgröße  $\geq 1,5$  (Zellen) oder  $\geq 2,0$  (CCM, EV) verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanz ist als  $* p \leq 0,05$



gezeigt. Es sind relative Mengen von behandelten verglichen mit unbehandelten Zellen dargestellt. hRPTEC: humane renale proximale Tubulusepithelzellen. TGF- $\beta$ : engl. *Tumor growth factor beta*. HSA: Humanes Serum-albumin. EV: Extrazelluläre Vesikel. CCM: engl. *Cell-conditioned medium* (Zellen-konditioniertes Medium). FDR: engl. *False discovery rate*. n.d.: nicht gemessen.

miRNA	TGF- $\beta$			HSA		
	CCM-EVs	CCM	hRPTECs	CCM-EVs	CCM	hRPTECs
let-7a-5p	10,56 *	1,64	1,00	n,d,	1,28	0,67
let-7b-5p	7,06 *	1,48	0,99	n,d,	1,37	0,61 *
let-7c-5p	10,44 *	1,59	0,97	n,d,	1,06	0,74
let-7d-5p	8,98 *	1,56	1,14	n,d,	1,00	0,76
let-7e-5p	8,88 *	1,63	1,01	n,d,	0,94	0,63 *
let-7f-2-3p	9,48 *	1,53	0,94	n,d,	1,24	0,68
let-7f-5p	11,23 *	1,24	1,04	n,d,	1,87	0,69
miR-106b-5p	8,44 *	1,21	1,09	n,d,	2,00	0,71
miR-10a-5p	10,00 *	1,37	0,96	n,d,	1,25	0,73
miR-10b-5p	8,71 *	1,17	0,82	n,d,	1,29	0,77
miR-122-5p	7,46 *	1,14	1,06	n,d,	1,61	0,85
miR-124-3p	7,62 *	2,48	1,28	n,d,	1,78	0,52
miR-125a-5p	8,43 *	1,45	1,25	n,d,	1,12	0,74
miR-125b-1-3p	9,87 *	0,57	1,72	n,d,	0,40 *	0,78
miR-125b-2-3p	7,78 *	1,03	0,82	n,d,	0,87	0,71
miR-125b-5p	8,44 *	1,10	0,92	n,d,	1,15	0,72
miR-130a-3p	8,10 *	1,19	0,92	n,d,	1,96	0,62 *
miR-130b-3p	7,79 *	1,25	1,00	n,d,	0,80	0,65 *
miR-130b-5p	9,02 *	1,21	1,08	n,d,	1,34	0,68
miR-132-3p	6,59 *	1,47	1,03	n,d,	1,36	0,69
miR-133a-3p	14,16 *	2,29 *	2,52	n,d,	1,61	0,72
miR-139-5p	8,18 *	0,82	0,79	n,d,	1,06	0,70
miR-145-5p	118,97 *	12,85 *	27,53 *	n,d,	1,74	0,73
miR-146a-5p	8,73 *	1,21	1,13	n,d,	1,32	0,83
miR-146b-5p	7,86 *	1,36	0,77	n,d,	1,11	0,75
miR-154-3p	51,16 *	2,15	11,11 *	n,d,	0,73	1,51
miR-155-5p	8,03 *	1,58	1,25	n,d,	2,45	0,71
miR-15b-5p	8,46 *	1,53	1,08	n,d,	1,13	0,82
miR-16-5p	8,89 *	1,27	0,97	n,d,	1,74	0,73
miR-17-5p	8,90 *	1,49	1,03	n,d,	0,93	0,69
miR-181c-5p	10,06 *	1,62	1,12	n,d,	1,25	0,62 *
miR-184	8,35 *	1,92	1,02	n,d,	0,96	0,74
miR-188-5p	5,74 *	1,15	0,82	n,d,	1,03	0,64
miR-190b	7,86 *	0,70	1,13	n,d,	0,77	0,75
miR-191-5p	8,86 *	1,52	1,02	n,d,	4,00	0,72
miR-19a-3p	8,48 *	1,50	1,14	n,d,	1,43	0,68
miR-19b-3p	8,35 *	1,25	1,13	n,d,	1,25	0,75
miR-200b-3p	9,71 *	1,24	1,15	n,d,	1,74	0,77
miR-205-5p	8,93 *	1,48	3,10 *	n,d,	1,97	1,28
miR-208a-3p	5,92 *	1,59	1,26	n,d,	0,97	0,46
miR-20a-5p	9,60 *	1,43	1,07	n,d,	0,96	0,66 *
miR-212-3p	7,54 *	1,58	1,33	n,d,	1,12	0,74
miR-214-3p	16,05 *	2,15 *	1,50	n,d,	1,00	0,87
miR-215-5p	6,93 *	1,15	0,95	n,d,	1,16	0,72
miR-216a-5p	29,92 *	2,50	1,61	n,d,	0,55	0,80
miR-216b-5p	17,15 *	1,57	1,26	n,d,	1,05	0,70
miR-218-5p	8,23 *	1,03	1,12	n,d,	0,89	0,67
miR-224-5p	10,37 *	1,53	1,63	n,d,	1,63	0,69
miR-23a-3p	11,14 *	2,13 *	1,57	n,d,	1,39	0,71
miR-23a-5p	12,44	1,38	1,57	n,d,	1,11	0,58 *
miR-24-3p	12,28 *	1,54	1,32	n,d,	1,24	0,73
miR-25-3p	8,45 *	1,65	1,09	n,d,	1,23	0,71
miR-26b-5p	9,47 *	1,40	0,91	n,d,	1,80	0,69
miR-27a-3p	11,08 *	1,78	1,42	n,d,	1,17	0,70
miR-28-5p	10,05 *	1,72	1,18	n,d,	2,98	0,67
miR-299-5p	14,26 *	3,04 *	3,15	n,d,	2,33	0,76
miR-29b-2-5p	5,66 *	0,80	0,80	n,d,	0,53	0,68
miR-29c-3p	11,67 *	1,27	1,01	n,d,	1,21	0,71
miR-30d-5p	6,71 *	1,14	0,84	n,d,	1,38	0,74
miR-31-3p	9,36 *	1,74	1,26	n,d,	3,24	0,70
miR-31-5p	10,05 *	1,52	1,38	n,d,	1,18	0,67
miR-330-3p	8,25 *	1,33	1,11	n,d,	1,00	0,70

miR-338-5p	11,51 *	3,92 *	1,60	n,d,	1,01	0,38
miR-342-3p	8,02 *	1,31	1,31	n,d,	1,00	0,75
miR-342-5p	6,55 *	1,54	1,16	n,d,	1,13	0,73
miR-34b-3p	11,44 *	1,81	0,79	n,d,	0,98	1,16
miR-34b-5p	8,61 *	2,54 *	0,88	n,d,	1,33	0,66
miR-34c-3p	4,73 *	0,91	1,06	n,d,	1,64	0,76
miR-34c-5p	7,70 *	1,41	0,92	n,d,	2,10 *	0,61 *
miR-362-3p	8,57 *	1,54	0,94	n,d,	1,33	0,71
miR-374b-5p	8,79 *	1,47	0,97	n,d,	2,42	0,69
miR-376b-3p	47,04 *	2,91	5,15	n,d,	0,65	0,71
miR-411-5p	22,80 *	3,78	3,35	n,d,	1,78	0,68
miR-424-5p	8,81 *	1,09	0,89	n,d,	0,87	0,64 *
miR-431-5p	11,06 *	0,64	1,70	n,d,	0,21 *	0,74
miR-450a-5p	8,00 *	1,53	0,88	n,d,	1,02	0,72
miR-484	6,10 *	1,16	1,08	n,d,	2,31	0,79
miR-487b-3p	17,92 *	2,93	2,53 *	n,d,	2,33	0,71
miR-488-5p	4,17 *	1,19	0,92	n,d,	0,8	0,66
miR-497-5p	9,89 *	1,33	1,01	n,d,	0,94	0,78
miR-500a-3p	7,38 *	1,52	1,08	n,d,	1,35	0,73
miR-503-5p	6,31 *	1,13	0,56	n,d,	1,01	0,93
miR-504-5p	9,21 *	0,40	2,08	n,d,	0,26	1,39
miR-532-3p	7,06 *	1,38	0,96	n,d,	1,33	0,74
miR-598-3p	7,46 *	1,25	0,95	n,d,	1,2	0,70
miR-708-5p	7,71 *	1,34	0,99	n,d,	2,36	0,79
miR-7-5p	7,22 *	1,03	0,85	n,d,	0,77	0,79
miR-874-3p	8,43 *	1,29	0,90	n,d,	1,14	0,75
miR-92a-3p	7,19 *	1,62	1,15	n,d,	2,02	0,66 *
miR-935	7,51 *	1,11	1,41	n,d,	1,09	0,74
miR-93-5p	8,17 *	1,62	1,16	n,d,	1,13	0,78
miR-9-3p	8,75 *	1,02	0,99	n,d,	0,74	0,64
miR-98-5p	9,69 *	1,10	0,97	n,d,	0,76	0,64 *

**Die vollständigen Listen aller deregulierten Gene, der IPA-Analyse, der vollständigen funktionellen Annotation aller miRNAs sowie die Rohdaten der Mikroarray-Experimente sind aufgrund des Datenumfangs auf Anfrage bei der Autorin erhältlich.**