

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

DISSERTATION

**Erste Untersuchungen zur Regulation und Funktion von
TMEM63C in humanen Nierenzellen**

**Initial studies on the regulation and function of TMEM63C in hu-
man kidney cells**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Miriam Orphal
aus Berlin

Datum der Promotion: 03.03.2023

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Abstract (Deutsch) | III |
| Abstract (Englisch) | IV |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Chronische Niereninsuffizienz..... | 1 |
| 1.2 Podozyten..... | 1 |
| 1.3 TMEM63C | 2 |
| 1.4 miRNA-abhängige post-transkriptionelle Regulation | 2 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit..... | 3 |
| 2. Methodik | 4 |
| 2.1 Zellkultur | 4 |
| 2.2 Real-Time PCR..... | 5 |
| 2.3 Western Blot | 6 |
| 2.4 Dual-Luciferase Activity Assay | 7 |
| 2.5 Bestimmung der Zellviabilität und Apoptose..... | 7 |
| 2.6 Statistische Analyse | 8 |
| 3. Ergebnisse | 9 |
| 3.1 Untersuchungen zur Regulation von TMEM63C in humanen Nierenzellen | 9 |
| 3.2 Untersuchungen zur Funktion von TMEM63C in humanen Nierenzellen | 10 |
| 4. Diskussion | 12 |
| 4.1 Regulationsmechanismen von TMEM63C in humanen Nierenzellen..... | 12 |
| 4.2 Funktionsanalysen zu TMEM63C in humanen Nierenzellen | 15 |
| 4.3 Zusammenfassung..... | 17 |
| 5. Literaturverzeichnis | 19 |
| Eidesstattliche Versicherung | 23 |
| Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen | 24 |

| | |
|---|-----------|
| Druckexemplar Publikation 1: <i>Miriam Orphal, Allan Gillespie, Karen Böhme, Jana Subrova, Andreas Eisenreich, Reinhold Kreutz; TMEM63C, a potential novel target for albuminuria development, is regulated by microRNA-564 and transforming growth factor beta in human renal cells; Kidney and Blood Pressure Research, 2020; 45(6):850-62</i> | 26 |
| Druckexemplar Publikation 2: <i>Andreas Eisenreich, Miriam Orphal, Karen Böhme, Reinhold Kreutz; Tmem63c is a potential pro-survival factor in angiotensin II-treated human podocytes; Life Sciences, 2020; 258:118175</i> | 42 |
| Lebenslauf | 54 |
| Publikationsliste | 56 |
| Danksagung..... | 57 |

Abstract (Deutsch)

Die chronische Niereninsuffizienz hat in unserer heutigen Bevölkerung eine hohe klinische Relevanz. Sie zeichnet sich durch eine irreversible Funktionseinschränkung der Niere aus und ist häufig mit einer Funktionsstörung des glomerulären Filterapparates assoziiert. Einen wichtigen Bestandteil dieses Filters stellen die Podozyten dar, zwischen deren Fußfortsätzen sich eine Schlitzmembran befindet, durch welche die selektive Filterung der Moleküle im Blut ermöglicht wird. Neuere Studien deuten darauf hin, dass das transmembrane Protein (TMEM) 63C möglicherweise eine pathophysiologisch relevante Rolle in der Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere und somit in der Entstehung der Albuminurie spielen könnte. TMEM63C ist ein Protein, dessen Regulation und funktionelle Bedeutung bislang noch nahezu unbekannt sind. Daher wurde in unseren Studien die Regulation der TMEM63C-Expression auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene in humanen Nierenzellen untersucht und erste Versuche bezüglich möglicher Funktionen von TMEM63C *in vitro* durchgeführt. In unseren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Expression von TMEM63C post-transkriptionell von der *micro*-RNA 564 reguliert wird. Zudem konnten wir nachweisen, dass die Expression von TMEM63C durch einflussreiche Mediatoren beeinflusst wird, welche eine tragende Rolle in inflammatorischen und fibrotischen Prozessen einnehmen. So kam es zu einem signifikanten Anstieg von TMEM63C unter der Stimulation humaner Nierenzellen mit dem proinflammatorischen Mediator Angiotensin II sowie dem profibrotischen Zytokin *transforming growth factor beta*. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Expression von TMEM63C durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells* reguliert wird. Des Weiteren führten wir Untersuchungen zu möglichen Funktionen von TMEM63C in humanen Nierenzellen durch. Erste Versuche in *human embryonic kidney 293*-Zellen lassen vermuten, dass TMEM63C in dem Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition über die Veränderung des Verhältnisses von *alpha-smooth muscle actin* zu E-Cadherin involviert sein könnte. Zudem konnten wir einen Einfluss von TMEM63C auf die Expression essenzieller Proteine der Funktion und des Überlebens von Podozyten wie Nephtrin oder Proteinkinase B nachweisen. Abschließend führten wir Untersuchungen zum Einfluss von TMEM63C auf die Zellviabilität und Apoptose durch. In unseren Versuchen ging eine Reduktion von TMEM63C mit einer erhöhten Apoptoserate und einem verminderten Zellüberleben bei humanen Podozyten einher. Dieser Effekt ließ sich auch unter Angiotensin II-Stimulation reproduzieren. Somit unterstützen unsere Ergebnisse die Befunde vorheriger Studien, welche darauf hindeuten, dass TMEM63C eine wichtige Bedeutung für den Erhalt der glomerulären Filtrationsbarriere und der Nierenfunktion besitzen könnte.

Abstract (Englisch)

Chronic kidney disease has a high clinical relevance for our population today. It is characterized by an irreversible functional impairment of the kidney in which impairment of glomerular filtration is a significant and early clinical sign. Podocytes are an important component of the glomerular filter. A slit membrane locates between the foot processes of podocytes and enables the selective filtering of molecules in the blood. Podocyte damage results in dysfunction of the glomerular filtration barrier and albuminuria. Recent studies suggest that the transmembrane Protein (TMEM) 63C may play a relevant role in the function of the glomerular filtration barrier and thus in the development of albuminuria. TMEM63C is a protein whose regulation and functional importance is only poorly characterized so far. Consequently, our studies investigated the regulation of TMEM63C expression on transcriptional and post-transcriptional level in human kidney cells and provided first experiments on the possible functions of TMEM63C in vitro. In our studies we demonstrated that the expression of TMEM63C is regulated post-transcriptionally by micro-RNA 564. Furthermore, we showed that the expression of TMEM63C is influenced by mediators that play a major role in inflammatory and fibrotic processes. Thus, a significant increase of TMEM63C was observed by stimulation of human kidney cells with the proinflammatory mediator angiotensin II or the profibrotic cytokine transforming growth factor beta. Furthermore, TMEM63C expression was shown to be regulated by the transcription factor nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells. In addition, we performed investigations on possible functions of TMEM63C in human kidney cells. First experiments in human embryonic kidney 293 cells suggest that TMEM63C might be involved in the process of epithelial-mesenchymal transition via the change of the ratio of alpha-smooth muscle actin to E-cadherin. Furthermore, we showed an influence of TMEM63C on the expression of essential proteins of podocyte function and survival, such as nephrin or protein kinase B in podocytes. Finally, we analyzed the influence of TMEM63C on cell viability and apoptosis. In our experiments a reduction of TMEM63C was associated with an increased rate of apoptosis and decreased cell survival in human podocytes in resting as well as in Ang II-stimulated cells.

Taken together, our results support the findings of previous studies suggesting that TMEM63C may play an important role in maintaining glomerular barrier and renal function.

1. Einleitung

1.1 Chronische Niereninsuffizienz

Weltweit sind 8-16 % der Bevölkerung von einer chronischen Niereninsuffizienz betroffen (1). Diese ist definiert als ein Funktionsverlust der Niere einhergehend mit einer verminderten glomerulären Filtrationsrate ($GFR < 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$) oder weiteren Anzeichen der Nierenschädigung, wie zum Beispiel der Albuminurie (Albumin-Kreatinin-Quotient $\geq 30 \text{ mg/g}$) oder einem pathologischen Urnsediment, über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten (1, 2). Die häufigsten Ursachen hierfür stellen die diabetische und die hypertensive Nephropathie dar (1, 2). Bei diesen Nephropathien kommt es zu einem strukturellen Umbau des Nierenparenchyms einhergehend mit einem Funktionsverlust der Niere (2). In diesem Zusammenhang wurde Angiotensin II (Ang II) als bedeutender Mediator für inflammatorische und fibrotische Prozesse im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz identifiziert (3). Es konnte nachgewiesen werden, dass Ang II die Expression proinflammatorischer und profibrotischer Gene u. a. über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B) und über das Zytokin *transforming growth factor beta* (TGF- β) beeinflussen kann (3, 4). Infolgedessen können erhöhte Ang II-Konzentrationen inflammatorische Schädigungen und fibrotische Umbauprozesse in der Niere hervorrufen und eine chronische Niereninsuffizienz begünstigen (3, 5).

1.2 Podozyten

Podozyten sind hochdifferenzierte Zellen, welche mit ihren Fußfortsätzen das viszerale Blatt der Bowmankapsel bilden und so der Basalmembran und dem gefensterten Endothel der Kapillaren aufliegen (6). Zwischen den Fortsätzen der Podozyten befindet sich eine Schlitzmembran, welche einen wichtigen Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) darstellt (6). Die Schädigung von Podozyten führt zur Albuminurie und ist daher von besonderer Relevanz in der Entstehung von renalen Erkrankungen (7, 8). Hierbei nimmt Nephrin als essenzielles Protein für die Funktionsweise der Schlitzmembran (9) sowie Proteinkinase B (Akt) eine bedeutsame Rolle für das Zellüberleben von Podozyten und somit im Erhalt der glomerulären Filterfunktion ein (9-11). Zudem wird dem Gewebshormon Ang II ein entscheidender Einfluss auf die Funktion und Viabilität von Podozyten, und folglich in der Entstehung und dem Progress der Nierenschädigung, zugesprochen (12, 13).

1.3 TMEM63C

Neuere Studien deuten darauf hin, dass das transmembrane Protein (TMEM) 63C möglicherweise einen pathophysiologisch relevanten Einfluss auf die Funktion der GFB und in der Entstehung der Albuminurie haben könnte (14). TMEM63C ist ein Protein, welches laut in silico-Analysen (www.genecards.org) in unterschiedlichen Geweben des menschlichen Organismus wie Herz, Gehirn und Niere exprimiert wird. Das humane TMEM63C-kodierende Gen gehört der TMEM63-Familie an und ist auf Chromosom 14 lokalisiert (www.genecards.org). Über die Funktion und Regulation des transmembranen Proteins ist bisher nur wenig bekannt. Zhao et al. vermuteten, dass TMEM63C zusammen mit TMEM63A und TMEM63B einen Komplex an der Zellmembran bilden könnte, welcher als osmosensitiver Kationenkanal für Ca^{2+} fungiert, wodurch TMEM63C einen wichtigen Einfluss auf die Osmorezeption und somit auf verschiedene zellbiologische Prozesse haben könnte (15). Zudem beschrieben Schulz et al. eine mögliche Bedeutung von TMEM63C für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion (14). So zeigten Schulz et al. eine verminderte TMEM63C-Expression in Podozyten von Patienten mit fokalsegmentaler Glomerulosklerose (FSGS) und beschrieben die besondere Bedeutung von TMEM63C im Erhalt der GFB in Zebrafischmodellen (14). Ferner wiesen Schulz et al. eine verminderte Viabilität von humanen Podozyten (hPC) unter TMEM63C-Suppression nach (14).

1.4 miRNA-abhängige post-transkriptionelle Regulation

Micro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) sind kurze, aus 20-22 Nukleotiden bestehende, nicht-proteinkodierende RNAs (16). Es wird angenommen, dass miRNAs an definierte *messenger*-RNAs (mRNAs) binden und so deren Translation hemmen bzw. die Ziel-mRNA destabilisieren oder zu ihrer Degradation führen (17). Auch wenn noch einiges über die Regulation, das Bindungsverhalten und die Funktion von miRNAs ungeklärt ist, vermutet man, dass miRNAs auf der post-transkriptionellen Ebene entscheidend auf die Regulation der Proteinexpression einwirken und so einen Einfluss auf den Erhalt der Nierenfunktion haben (16, 17). So wurden bereits verschiedene miRNAs, wie z.B. miRNA-21 (miR-21), miR-29 und miR-200, identifiziert, welche durch TGF- β reguliert werden und den Prozess der Nierenfibrose beeinflussen (18). Zudem wurde den miRNAs eine besondere Bedeutung in der Entwicklung von malignen Erkrankungen zugesprochen, wie z.B. miR-21, miR-22 und miR-566 in der Pathogenese von Nierenzellkarzinomen (19-21).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Erste Studien deuten darauf hin, dass TMEM63C eine wichtige Bedeutung für den Erhalt der Nierenfunktion haben könnte. Dennoch ist die Regulation und Funktion von TMEM63C bislang weitgehend unbekannt. Daher wurden im Folgenden Regulationsmechanismen von TMEM63C auf post-transkriptioneller sowie auf transkriptioneller Ebene in humanen Nierenzellen betrachtet. Hierbei wurde die post-transkriptionelle Regulation von TMEM63C durch die miRNAs miR-30b und miR-564 in *human embryonic kidney 293*-Zellen (HEK 293) und hPC untersucht. Auf transkriptioneller Ebene wurde zudem der Einfluss des inflammatorischen Mediators Ang II und des Transkriptionsfaktors NF κ B sowie die Wirkung des profibrotischen Zytokins TGF- β auf die Expression von TMEM63C betrachtet. In ersten Funktionsanalysen untersuchten wir einen möglichen Effekt von TMEM63C auf die Expression verschiedener Proteine, welche einen großen Einfluss auf das Zellüberleben und die Nierenfunktion besitzen, wie Nephritin und Akt in hPC, und epithelialer und mesenchymaler Proteine in HEK 293. Des Weiteren führten wir verschiedene Experimente durch, um die Bedeutung von TMEM63C für die Viabilität humaner Nierenzellen zu analysieren.

2. Methodik

2.1 Zellkultur

HPC

HPC sind differenzierte Nierenzellen, welche unter physiologischen Bedingungen nicht proliferieren. Für die folgenden Experimente wurde eine humane Zelllinie (bereitgestellt von Dr. M. Saleem, MA, Academic and Children's Renal Unit, University of Bristol, Bristol, UK) verwendet, welche mit einem temperatursensitiven SV40T-Gen transfiziert worden ist (22). Dieses Gen ermöglicht, dass hPC bei 33 °C proliferieren und anschließend bei 37 °C zu physiologisch-nahen Podozyten differenzieren (22). Die Zellen wurden in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 kultiviert, welches mit 10 % *fetal bovine serum* (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 x *Insulin-Transferrin-Selenium* (ITS) versetzt worden ist (alles hergestellt von Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland). Der Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Für die Untersuchungen wurden die Zellen zunächst in Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, Deutschland) ausgesät und in einem Inkubator (*Function Line*, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) bei 33 °C und 95 % Luftfeuchte mit 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Nachdem die Zellen sich ausreichend vermehrt hatten, wurde die Zellkultur zu 37 °C überführt, was zur Differenzierung der Zellen führte. Dieser Prozess war nach 14 Tagen abgeschlossen. Anschließend wurden die im Folgenden dargestellten Experimente durchgeführt.

HEK 293

Aufgrund ihrer guten Transfizierbarkeit und als geeignete Zellreihe zur Untersuchung von epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften in Nierenzellen (23) wurden auch einige Experimente in HEK 293 durchgeführt. Diese Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Fechner (Technische Universität Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der HEK 293 erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), welches mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin angereichert worden ist. Für die nachfolgenden Experimente wurden die Zellen zunächst in Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte mit 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Das Medium wurde im Abstand von zwei bis drei Tagen gewechselt.

Transfektion

Für die miRNA-vermittelte Inhibition wurden HEK 293 bzw. hPC entweder mit *Mimics* für miR-30b, miR-564 oder einer negativen Kontroll-miRNA (miR-control), jeweils mit einer Konzentration von 200 nM, für 48 h transfiziert. Für die *small interfering* (si)RNA-vermittelte Inhibition

wurden die Zellen mit 200 nM TMEM63C-siRNA (siTMEM63C) bzw. einer negativen Kontroll-siRNA (siControl) transfiziert. Für die Transfektion wurden 200.000 Zellen je Well in 12-Well-Platten (Sarstedt AG & CO., Nürnberg, Deutschland) ausgesät. Am Abend vor der Transfektion wurden die Zellen mit einem FBS- und antibiotikafreiem Medium versetzt. Die Transfektion der hPC bzw. HEK 293 erfolgte mittels *Lipofectamine*[®]2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), den Herstellerangaben folgend. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet. Zellen, die für die Proteinanalysen vorgesehen waren, wurden in *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA-Puffer) lysiert. Die Proben, die für die Analyse der mRNA-Expression bestimmt waren, wurden in mRNA-Lyse-Puffer gelöst (*Universal RNA Purification Kit*, Roboklon GmbH, Berlin, Deutschland). Vor der weiteren Analyse wurden diese Proben bei -80 °C eingefroren. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte mittels einer Dy547-markierten Transfektionskontrolle (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte, Deutschland) und betrug 25 % für hPC und 62 % für HEK 293. Der inhibitorische Effekt der siRNA wurde auf mRNA- und Proteinebene validiert ([P2], Fig. 4A, B).

Stimulation

Für unsere Versuche wurden sowohl HEK 293 als auch hPC mit 5 ng/ml bzw. 10 ng/ml TGF- β (Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, USA) für 48 h stimuliert. Zudem erfolgte eine Stimulation von hPC mit verschiedenen Konzentrationen von Ang II (10/100/1000 nM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) für 0,5 h, 8 h bzw. 24 h. Für die Inhibitionsexperimente mit dem NF κ B-Inhibitor BAY 11-7082 wurden hPC für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen BAY 11-7082 (0,1/1/10 μ M; Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Für die Untersuchungen mit dem NF κ B-Inhibitor und Ang II wurden die hPC zunächst für 1 h mit 1 μ M bzw. 10 μ M BAY 11-7082 vorbehandelt und anschließend mit 1 μ M Ang II für 24 h stimuliert.

2.2 Real-Time PCR

Um die Expression verschiedener Proteine auf mRNA-Ebene beurteilen zu können, wurde eine *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierfür erfolgte die Isolation der Gesamt-mRNA aus den Proben mit Hilfe des *Universal RNA Purification Kits* (Roboklon GmbH, Berlin, Deutschland). Nach Messung der mRNA-Konzentration der einzelnen Proben mittels *NanoDrop*[™] 1000 *Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Hennigsdorf, Deutschland), wurde die mRNA mit Hilfe des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) in die entsprechende *complementary* DNA (cDNA)

umgeschrieben. Für die *Real-Time* PCR kamen verschiedene spezifische *TaqmanTM Gene Expression Assays* (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) zur Bestimmung der mRNA-Expression von TMEM63C, Nephrin, *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA), E-Cadherin bzw. Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) zum Einsatz. Zudem wurde das *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) unter folgenden Bedingungen verwendet: 50 °C, 2 Minuten; 95 °C, 20 Sekunden; 45 Zyklen: 95 °C, 3 Sekunden; 60 °C, 30 Sekunden. Die Primer, welche für die PCR genutzt wurden, sind in Tab. 1 hinterlegt ([P1], Tab. 1).

2.3 Western Blot

Um die Expression auf Proteinebene beurteilen zu können, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die in RIPA-Puffer gelösten Proteinlysate aus den transfizierten bzw. stimulierten Zellen verwendet. 20 μ g der isolierten Proteine wurden mit Lämmli-Ladepuffer in einem Verhältnis von 3:1 versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und abzentrifugiert (Thermomixer *Comfort* und *Centrifuge 5417*, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Daraufhin wurden die Proteine mit Hilfe einer Natriumdodecylsulfat-Poly-acrylamidgелеlektrophorese (SDS-Page) der Größe nach aufgetrennt. Nach dem Geldurchlauf erfolgte mittels *semi-dry* Blot die Übertragung der Proteine von dem Gel auf eine, zuvor mit Methanol aktivierte, Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Im Anschluss wurde die Membran für 1 h in einer 5 % Milch-*Tris-buffered-saline-with-Tween20* (TBST)-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit einem spezifischen Antikörper, welcher gegen das Zielprotein TMEM63C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), Akt bzw. phosphoryliertes Akt (pAKT, Ser₄₇₃; beide hergestellt von Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland), *inhibitor of NF κ B-alpha* (I κ B α) bzw. phosphoryliertes I κ B α (pI κ B α ; beide hergestellt von Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) oder GAPDH (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) gerichtet war, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in TBST-Lösung gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur und abgedunkelt mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet war (*Goat anti-rabbit* IgG-Antikörper, HRP-konjugiert; *Rabbit anti-mouse* IgG-Antikörper, HRP-konjugiert; beide hergestellt durch DAKO, Glostrup, Dänemark). Mittels einer chemielumineszenzbasierten Detektionsmethode (*SuperSignalTM West Dura Extended Duration Substrate*, Thermo Fisher Scientific GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) konnte das Bandenmuster der Proteine auf der PVDF-

Membran mit Hilfe des *Fusion FX7 Systems* (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) charakterisiert und visualisiert werden. Die Analyse und Quantifizierung der Western Blot-Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der *Gel-Pro AnalyzerTM Software* (Version 4.0.00.001; Media cybernetics, Bethesda, MD, USA).

2.4 Dual-Luciferase Activity Assay

Um den direkten Einfluss der miRNAs auf TMEM63C zu untersuchen, wurde das *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* von Promega GmbH (Mannheim, Deutschland), den Herstellerangaben folgend, verwendet. Für die Bestimmung der *Dual-Luciferase[®]* Aktivität wurden zunächst 2×10^4 HEK 293 in 96-Well-Platten ausgesät und mit miR-30b, miR-564 oder miR-control und 200 ng *Dual-Luciferase[®]* Reportervektor transfiziert. Hierbei enthielt der experimentelle Reportervektor den 3' untranslatierten Bereich (3'UTR) von TMEM63C (3'UTR-TMEM63C vec; hergestellt von GeneCopeia, Inc., Rockville, MD, USA). Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion von HEK 293 mit miR-564 bzw. miR-control und einem *Dual-Luciferase[®]* Reportervektor, in welchem der experimentelle Reporter eine mutierte Form der 3'UTR von TMEM63C aufwies (3'UTR-TMEM63C-mut vec), bzw. einem negativen Kontrollvektor (control vec; alle hergestellt von GeneCopeia, Inc., Rockville, MD, USA). Nach 24 h wurde die Aktivität der experimentellen Reportervektoren durch die Lumineszenz der *firefly*-Luciferase und die Aktivität des Kontroll-Reporters durch die Lumineszenz der *renilla*-Luciferase gemessen.

2.5 Bestimmung der Zellviabilität und Apoptose

Trypan Blue Staining Assay

Zur Bestimmung des Zellüberlebens von HEK 293 wurde der *Trypan Blue Staining Assay* von Biochrom GmbH (Berlin, Germany) verwendet. Hierfür wurden zunächst 2×10^5 HEK 293 in 12-Well-Platten ausgesät und mit 200 nM siTMEM63C oder 200 nM siControl transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA aus den Wells gelöst und in DMEM resuspendiert. Anschließend wurden 10 μ l der Zellsuspension mit 90 μ l der Trypanblau-Lösung gemischt. Da Trypanblau-Lösung von den apoptotischen, jedoch nicht von den lebenden Zellen aufgenommen wird, konnten diese mit Hilfe einer C-Chip Neubauerkammer (Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe, Deutschland) mikroskopisch unterschieden und quantifiziert werden.

Calcein AM Cell Viability Assay

Mit Hilfe des *Calceinacetoxymethyl (AM) Cell Viability Kits* (Trevigen Inc. Gaithersbrug, MD, USA) erfolgte die Bestimmung des Zellüberlebens von hPC. Hierfür wurden 1×10^4 hPC in 96-Well-Platten ausgesät und mit siTMEM63C bzw. siControl für 24 h transfiziert. Des Weiteren wurden hPC zusätzlich für 24 h mit $1 \mu\text{l}$ Ang II stimuliert. Danach wurde die Suspension entfernt, die Zellen gewaschen und mit der Calcein AM Lösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anhand der Fluoreszenzintensität der durch das Calcein gebundenen Calcium-Ionen konnte die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt werden. Die Fluoreszenz wurde mit einem Anregungsfilter bei 490 nm und einem Emissionsfilter bei 520 nm gemessen.

Apoptose Assay

Zur Bestimmung der Apoptose von Ang II-stimulierten hPC wurde das *Cytochrom C Releasing Apoptosis Assay Kit* von BioVision Inc. (Milpitas, California, USA) verwendet. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit siTMEM63C und der siControl transfiziert und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ Ang II für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert. Durch die anschließende Trennung der mitochondrialen Fraktion vom Zytosol konnte das aus den Mitochondrien freigesetzte Cytochrom C mittels eines spezifischen Antikörpers im Western Blot quantifiziert und so die Apoptose nachgewiesen werden.

2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der erhaltenen Daten wurde mit Hilfe der Software *GraphPad Prism* (Version 6.00, GraphPad Software Inc., San Francisco, USA) durchgeführt. Die statistischen Untersuchungen erfolgten mit dem *Student's t-Test* oder *one-way ANOVA*. Hierbei wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Regulation von TMEM63C in humanen Nierenzellen

Der Einfluss verschiedener miRNAs auf die Regulation von TMEM63C

In in silico-Analysen wurden miR-30b und miR-564 als potenzielle Kandidaten für die post-transkriptionelle Regulation von TMEM63C identifiziert. Für die Analysen wurden die Datenbanken *TargetScanHuman 7.1* (www.targetscan.org), *miRDB* (www.mirdb.org) und *Diana Tools* (www.diana.imis.athena-innovation.gr) verwendet. In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss dieser miRNAs auf die Proteinexpression von TMEM63C in HEK 293 bestimmt. Hierbei kam es nach der Transfektion von HEK 293 mit miR-30b bzw. miR-564 zu einer signifikanten Reduktion der TMEM63C-Proteinexpression nach 48 h ([P1], Fig. 1). Um zu bestätigen, dass diese reduzierte Expression von TMEM63C durch eine direkte Bindung der miRNA an die mRNA von TMEM63C erfolgte und nicht durch einen sekundären Effekt zu erklären ist, wurden HEK 293 in einem weiteren Experiment mit den oben genannten miRNAs und *Dual-Luciferase*[®] Reportervektoren transfiziert. Während die Co-Transfektion von HEK 293 mit miR-564 und dem Reportervektor 3'UTR-TMEM63C vec zu einer signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität führte, zeigte die Co-Transfektion dieser Zellen mit miR-30b und 3'UTR-TMEM63C vec keine signifikante Veränderung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ([P1], Fig. 2a). Im Gegensatz dazu führte die Co-Transfektion von HEK 293 mit miR-564 und den Kontrollvektoren zu keiner signifikanten Veränderung der Luciferase-Aktivität ([P1], Fig. 2b, 2c). Abschließend wurde der Einfluss von miR-564 auf die TMEM63C-Expression auch in hPC untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich 48 h nach Transfektion eine signifikante Reduktion von TMEM63C auf mRNA-Ebene ([P1], Fig. 6).

TMEM63C wird durch Ang II induziert

In den nachfolgenden Versuchen wurden hPC mit verschiedenen Konzentrationen von Ang II stimuliert und die TMEM63C-Expression nach 8 h bzw. 24 h betrachtet. In den Versuchen ließ sich sowohl ein zeit- als auch ein konzentrationsabhängiger Anstieg der TMEM63C-Expression auf mRNA-Ebene nachweisen ([P2], Fig. 1B, C).

NFκB reguliert die TMEM63C-Expression

Es ist bereits bekannt, dass der NFκB-Signalweg durch Ang II aktiviert wird (10, 24). Damit übereinstimmend führte auch in unseren Versuchen eine Stimulation der hPC mit Ang II konzentrationsabhängig zu einer vermehrten Phosphorylierung von IκBα ([P2], Fig. 2A). Im Folgenden sollte

der Einfluss von NFκB auf die Expression von TMEM63C untersucht werden. Zunächst wurden in silico-Analysen (www.genecards.org) durchgeführt. Diese zeigten, dass die Expression von TMEM63C potenziell durch NFκB reguliert wird. In einem weiteren Schritt wurde das Expressionsverhalten von TMEM63C unter der Inhibition von NFκB untersucht. Hierbei war eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von TMEM63C unter 10 μM Bay 11-7082 nach 24 h zu beobachten ([P2], Fig. 2B). Da wir in unseren Untersuchungen nachweisen konnten, dass Ang II sowohl die Aktivität von NFκB als auch die Expression von TMEM63C beeinflusst, interessierte uns im Folgenden das Expressionsverhalten von TMEM63C unter der Inhibition von NFκB in Ang II-stimulierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die vermehrte TMEM63C-Expression in Ang II-stimulierten Zellen durch Bay 11-7082 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene supprimiert wird ([P2], Fig. 2 C, D). Ferner führte die NFκB-Inhibition mit Bay 11-7082 auch in den nicht-stimulierten Zellen zu einer signifikanten Reduktion von TMEM63C auf Proteinebene ([P2], Fig. 2D).

TGF-β induziert TMEM63C

Des Weiteren analysierten wir den Einfluss von TGF-β auf die Expression von TMEM63C. Hierfür stimulierten wir sowohl HEK 293 als auch hPC mit 5 ng/ml bzw. 10 ng/ml TGF-β. Nach 48 h war in beiden Zelllinien ein konzentrationsabhängiger Anstieg von TMEM63C auf Proteinebene nachweisbar ([P1], Fig. 4, 7).

3.2 Untersuchungen zur Funktion von TMEM63C in humanen Nierenzellen

TMEM63C beeinflusst das Verhältnis von α-SMA zu E-Cadherin

Im Folgenden wurde der Einfluss von TMEM63C auf die Expression der epithelial-mesenchymalen Transitions (EMT)-Marker α-SMA und E-Cadherin betrachtet. Hierfür wurden HEK 293 mit siTMEM63C für 48 h transfiziert und im Anschluss das Verhältnis der mRNA-Expression dieser beiden Marker analysiert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich ein signifikanter Anstieg von α-SMA zu E-Cadherin in siTMEM63C-transfizierten Zellen ([P1], Fig. 5).

Die Expression von Nephrin und Akt wird von TMEM63C beeinflusst

In weiteren Versuchen wurden hPC mit spezifischen siRNAs gegen TMEM63C transfiziert und anschließend die Expression von Nephrin auf mRNA-Ebene ausgewertet. Nach 48 h war eine signifikante Reduktion von TMEM63C in den siTMEM63C-transfizierten Zellen zu erkennen ([P1], Fig. 8a). Zudem zeigte sich nach der Transfektion eine signifikante Reduktion von Nephrin im Vergleich zur Kontrolle ([P1], Fig. 8b). Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss von

TMEM63C auf die Phosphorylierung von Akt in hPC. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte die Transfektion von hPC mit siTMEM63C eine signifikante Verringerung von pAkt zu Akt auf Proteinebene ([P2], Fig. 4C).

TMEM63C beeinflusst die Zellviabilität und Apoptose

Um den Einfluss von TMEM63C auf die Zellviabilität beurteilen zu können, wurden HEK 293 mit siTMEM63C transfiziert. Nach 48 h kam es zu einer signifikanten Reduktion der TMEM63C Expression ([P1], Fig. 3a). Gleichzeitig zeigte sich eine signifikante Reduktion der Viabilität in siTMEM63C-transfizierten Zellen ([P1], Fig. 3b). Auch in hPC ließen sich diese Ergebnisse reproduzieren ([P2], Fig. 4A, B, D). Zudem zeigte ein weiteres Experiment einen signifikanten Anstieg der proapoptotischen Translokation von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma in siTMEM63C-transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ([P2], Fig. 4F). In einem weiteren Versuch wurde die Apoptoserate der Podozyten unter Ang II-Stimulation mit und ohne Suppression von TMEM63C untersucht. In den Ang II-stimulierten hPC war unter der verminderten Expression von TMEM63C eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens nachweisbar im Vergleich zur Kontrolle, in welcher die Zellen mit siControl transfiziert worden sind ([P2], Fig. 4E). Passend hierzu kam es in den Ang II-aktivierten Zellen unter TMEM63C-Suppression zu einer signifikanten Erhöhung der Cytochrom C-Translokation von den Mitochondrien in das Zytosol im Vergleich zur Kontrolle ([P2], Fig. 4G).

4. Diskussion

Über die funktionelle Bedeutung von TMEM63C ist bislang nur wenig bekannt. Neuere Untersuchungen legen aber nahe, dass TMEM63C möglicherweise eine bedeutende Rolle für den Erhalt der glomerulären Filterfunktion und das Zellüberleben von Podozyten einnehmen könnte (14). In unseren Studien haben wir erstmals Regulationsmechanismen und mögliche Funktionen von TMEM63C in humanen Nierenzellen untersucht. In unseren Versuchen wurde gezeigt, dass die Expression von TMEM63C durch miR-564 auf post-transkriptioneller Ebene und durch Ang II, NFκB sowie TGF-β auf transkriptioneller Ebene beeinflusst wird. Zudem konnten wir in ersten Funktionsanalysen einen Einfluss von TMEM63C auf die Expression verschiedener Proteine, welche für die Nierenfunktion und das Zellüberleben eine hohe Relevanz haben, wie Nephrin und Akt in hPC sowie die EMT-Marker α-SMA und E-Cadherin in HEK 293, nachweisen. Darüber hinaus konnte unter TMEM63C-Suppression eine verminderte Viabilität von HEK 293 und hPC beobachtet werden.

4.1 Regulationsmechanismen von TMEM63C in humanen Nierenzellen

Die post-transkriptionelle Regulation von TMEM63C durch miR-564

MiRNAs sind Gegenstand aktueller Forschung (16, 18, 25). Viele Studien weisen darauf hin, dass diese nicht-kodierenden RNAs eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen wie auch in der Entstehung von Malignomen einnehmen könnten (25, 26). So wurde gezeigt, dass die Entstehung von Nierenerkrankungen wie der diabetischen oder hypertensiven Nephropathie aber auch von Nierenzellkarzinomen durch miRNAs, wie z.B. miR-21 und miR-192, beeinflusst wird (26-28). Daher erhofft man sich miRNAs in der Diagnostik aber auch als Verlaufsparemeter innerhalb von Nierenerkrankungen zukünftig einsetzen zu können (25, 29). Da über TMEM63C bislang nur wenig bekannt ist, jedoch diesem Protein eine mögliche bedeutsame Rolle in der Entstehung von Nierenerkrankungen zugesprochen wird, wurde in unseren Experimenten die Regulation von TMEM63C durch miRNAs näher untersucht. Um miRNAs zu identifizieren, welche potenziell an die regulatorische 3'UTR der TMEM63C-mRNA binden, wurden zunächst in silico-Analysen durchgeführt. In silico-Analysen basieren auf Algorithmen, welche die Bindungswahrscheinlichkeit einer miRNA an die Zielsequenz innerhalb der 3'UTR einer entsprechenden Ziel-mRNA vorhersagen (30). Diese Vorhersagen sind schwierig zu stellen und beruhen auf verschiedenen Parametern, sodass sich die Ergebnisse bezüglich der Bindungswahrscheinlichkeiten zwischen den verschiedenen Datenbanken unterscheiden können (31). Daher gelten in der Literatur miRNAs als geeignet, welche in mindestens zwei bis drei unterschiedlichen Datenbanken das gleiche

Bindungsziel aufzeigen (30). In den in silico-Analysen wurden miR-30b und miR-564 als wahrscheinliche Regulatoren der mRNA von TMEM63C nach den oben genannten Kriterien identifiziert. In unseren in vitro-Versuchen konnte TMEM63C als direktes Ziel von miR-564 bestätigt werden. Dahingegen konnte eine direkte Regulation von TMEM63C durch miR-30b in unseren Versuchen nicht bewiesen werden.

Aktuelle Studien berichteten über die Relevanz von miR-564 in der Pathogenese verschiedener Karzinome (32-34). So beschrieben Ru et al. eine Apoptoseinduktion und eine verminderte Proliferation von Osteosarkomzellen über die miR-564-abhängige Regulation von Akt (32). Außerdem wird miR-564 im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom eine wichtige Funktion als Suppressor der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) zugesprochen (33). Darüber hinaus beschrieben Mutlu et al. einen inhibitorischen Effekt von miR-564 auf die EMT und Invasion bzw. Migration der Zellen des Mammakarzinoms (33). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass TGF- β durch miR-564 reguliert wird (34, 35). So zeigten Jiang et al. eine Reduktion der TGF- β Expression in Glioblastomzellen (34), während im Gegensatz dazu Xiao et al. eine Induktion von TGF- β bei erhöhter miR-564-Konzentration im hypertrophen Narbengewebe diskutierten (35). Es ist bekannt, dass miR-564 im Nierengewebe exprimiert wird (36), jedoch wird miR-564 im Zusammenhang mit renalen Erkrankungen bisher nicht genannt. Dennoch könnte miR-564 durch die Regulation von TGF- β nicht nur in Malignomen, sondern auch in der Entstehung von Nierenerkrankungen eine besondere Bedeutung zu kommen.

Der Einfluss von Ang II auf die Expression von TMEM63C

Ang II ist ein kreislaufregulierender Mediator, welcher über Ang II-Rezeptoren zur Vasokonstriktion, Sympathikusaktivierung und Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde führt (37). Zudem zeigten verschiedene Studien, dass Ang II im Rahmen der hypertensiven Nephropathie an relevanten pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist und durch die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden inflammatorische und fibrotische Prozesse in der Niere begünstigt, wodurch es zu einem Funktionsverlust der Niere, einhergehend mit Albuminurie, kommen kann (4, 37-39). So beschrieben Ding et al., dass Ang II u. a. über den Transkriptionsfaktor NF κ B oder auch über die TGF- β /SMAD3-Signalkaskade seine Wirkung in den Zellen entfaltet und es so zur Expression von Zytokinen wie TNF- α oder IL-1 β und zur Induktion einer Nierenfibrose kommt (4). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass es unter der Ang II-Stimulation zu einer Hemmung des Nephren-Akt-Signalweges kommt, woraus ein Funktionsverlust und eine vermehrte Zelloptose der Podozyten resultieren kann (39). Währenddessen beschrieben Hu et al. eine vermehrte Aktivierung

des PI3K/Akt-Signalweges unter Ang II-Stimulation einhergehend mit fibrotischen Prozessen in chronischen Nierenerkrankungen (40). In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von hPC mit Ang II, TMEM63C konzentrations- und zeitabhängig induziert.

Die transkriptionelle Regulation von TMEM63C über NFκB

NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, welchem eine bedeutende Rolle im Rahmen der Zytokinproduktion, Zellproliferation und im Zellüberleben zukommt (10). In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass Ang II zu einer verstärkten Phosphorylierung von IκBα und p65 führt, wodurch es zu einer vermehrten Translokation des aktivierten NFκB-Komplexes in den Zellkern mit einer gesteigerten DNA-Bindungsaktivität kommt (4, 24). Dieser Prozess wird als wichtiger Vorgang in der chronischen Inflammation, durch die Regulation proinflammatorischer Zytokine, beschrieben (24). In unseren Versuchen war unter der Inhibition von NFκB eine signifikante Reduktion der TMEM63C-Expression in hPC erkennbar. Ferner ließ sich dieser Effekt nicht durch eine Ang II-Stimulation beeinflussen, sodass die Vermutung naheliegt, dass die Expression von TMEM63C unter physiologischen sowie unter pathophysiologischen Bedingungen durch NFκB reguliert wird.

Die Bedeutung von TGF-β auf die Expression von TMEM63C

TGF-β ist ein profibrotisches Zytokin und stellt ein zentrales Signalprotein bei der Entstehung von glomerulären und tubulointerstitialen Pathologien im Rahmen der chronischen Nierenerkrankungen dar (41, 42). So führt TGF-β zu einer tubulointerstitialen Fibrose und zur Dysfunktion von Podozyten (43). In diesem Zusammenhang diskutierten Lee et al. eine Induktion der Apoptose, eine Loslösung der Podozyten von der Basalmembran und den Prozess der EMT in Podozyten unter erhöhten TGF-β-Konzentrationen (44). Ying et al. bestärkten einen maßgeblichen Einfluss von TGF-β auf die EMT in Podozyten mit daraus resultierender Fibrose und Proteinurie als mögliche Folgen (45). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Expression von TGF-β durch miR-564 (34, 35) und Ang II beeinflusst wird (4, 46). Da miR-564 und Ang II ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von TMEM63C haben, untersuchten wir im Folgenden die Wirkung von TGF-β auf die TMEM63C-Expression in Nierenzellen. In unseren Versuchen ließ sich sowohl in HEK 293 als auch in hPC ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Bildung von TMEM63C unter TGF-β-Stimulation zeigen.

In unseren Untersuchungen zu den Regulationsmechanismen von TMEM63C konnte nachgewiesen werden, dass TMEM63C durch pathophysiologisch relevante Mediatoren kontrolliert wird,

welche u. a. im direkten Zusammenhang mit Inflammation und Fibrose stehen. Gleichzeitig beschrieben Schulz et al. einen protektiven Effekt von TMEM63C auf die glomeruläre Filterfunktion und das Zellüberleben von Podozyten (14). Daher interessierte uns, welche konkrete Funktion TMEM63C im Erhalt der Nierenfunktion und der Zellviabilität einnehmen könnte. Um diese Frage beantworten zu können, wurden im Folgenden Experimente zu den möglichen Einflüssen von TMEM63C auf Proteine durchgeführt, die relevant für die Steuerung von der Nierenfunktion und das Zellüberleben sind.

4.2 Funktionsanalysen zu TMEM63C in humanen Nierenzellen

Der Einfluss von TMEM63C auf das Verhältnis von α -SMA zu E-Cadherin

In der Literatur wird die durch TGF- β initiierte EMT als Ursache für den Funktionsverlust der Niere bei den chronischen Nierenerkrankungen kritisch diskutiert (47, 48). Während einige Studien den Einfluss der EMT in Nierenzellen anzweifeln (48, 49), scheint die aktuelle Datenlage sich für einen - zumindest partiellen – Einfluss der EMT im Rahmen der chronischen Destruktion des Gewebes auszusprechen (47, 50). Auch wenn die EMT in Nierenzellen Gegenstand aktueller Debatten ist, haben wir einen möglichen Einfluss von TMEM63C auf die EMT untersucht, da TMEM63C sowohl durch miR-564, welche die EMT in malignen Prozessen unterdrückt (33), als auch durch TGF- β , welcher als Initiator der EMT gilt (42), beeinflusst wird. In der EMT verlieren Zellen ihre epithelialen Eigenschaften und entwickeln einen mesenchymalen Phänotyp (51). In der Literatur werden verschiedene Proteine beschrieben, die typischerweise vorrangig in epithelialen Zellen exprimiert werden, wie E-Cadherin oder Fibronectin und Proteine, welche in mesenchymalen Zellen vermehrt auftreten, wie N-Cadherin, α -SMA oder Vimentin (52). Da HEK 293 sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker exprimieren (23), wurde diese Zelllinie genutzt, um in ersten Versuchen eine mögliche Wirkung von TMEM63C auf die EMT zu untersuchen. Hierbei wurde, Du et al. folgend, die signifikante Veränderung des Verhältnisses von α -SMA zu E-Cadherin als möglicher Indikator für eine tubuläre EMT angesehen (53). In unseren Versuchen zeigte sich unter der verminderten TMEM63C-Expression ein Anstieg von α -SMA im Verhältnis zu E-Cadherin. Während diese Ergebnisse auf eine Begünstigung der tubulären Fibrose unter TMEM63C-Suppression hinweisen, zeigte sich unter TGF- β -Stimulation eine erhöhte Expression von TMEM63C. Dieser Anstieg könnte als ein protektiver Mechanismus von TMEM63C unter pathophysiologischen Bedingungen, wie sie beispielsweise bei der renalen Fibrose vorkommen, interpretiert werden. Es sollten jedoch weitere Experimente durchgeführt werden, um die Bedeutung von TMEM63C in EMT-Prozessen und der Expressionskontrolle von Proteinen, welche in der tubulären Fibrose involviert sind, besser beurteilen zu können.

Der Effekt von TMEM63C auf die Nephrexpression

Nephrin stellt ein essenzielles Strukturprotein der Schlitzmembran und somit des glomerulären Filters dar (9). Ein Mangel an Nephrin ist mit Albuminurie und einer verminderten Viabilität der Podozyten assoziiert (9). Schulz et al. beschrieben unter der Suppression von TMEM63C eine Albuminurie in Zebrafischmodellen und konnten ein vermindertes Zellüberleben in Podozyten nachweisen (14). In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass eine verminderte Expression von TMEM63C zu einer verminderten Nephrin-Expression führt. Dies wiederum stützt die Beobachtung von Schulz et al., dass TMEM63C eine wichtige Rolle im Erhalt der Nierenfunktion einnehmen könnte (14).

Zudem wird der Prozess der EMT nicht nur in HEK 293, sondern auch in hPC beschrieben. Da hPC als atypische epitheliale Zellen diskutiert werden, zeigt sich hier ein verändertes Expressionsmuster in der EMT (54). Bei der EMT in Podozyten, welche auch als „*podocyte disease transformation*“ bezeichnet wird (54), wird eine reduzierte Expression von Podocin, Nephrin und P-Cadherin beschrieben, während es zu einem Anstieg von α -SMA und N-Cadherin kommt (45). Die verminderte Expression von Nephrin unter TMEM63C-Suppression könnte somit wiederum auf eine protektive Funktion von TMEM63C innerhalb pathophysiologischer Prozesse hindeuten.

Die Wirkung von TMEM63C auf die Phosphorylierung von Akt

Akt ist eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase, welche eine entscheidende Rolle in der Regulation von verschiedenen Zellprozessen wie Apoptose, Proliferation oder Zellmigration spielt (10). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass es über eine Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges zu einer verminderten Apoptose von Nierenzellen kommt (11, 55, 56). Der Einfluss des PI3K/Akt-Signalweges auf die Entstehung der interstitiellen Fibrose wird hingegen kontrovers diskutiert (40, 55). Während Lin et al. eine Inhibierung der interstitiellen Fibrose über den PI3K/Akt-Signalweg vermuteten (55), konnten durch Hu et al. eine Förderung der interstitiellen Fibrose über den PI3K/Akt-Signalweg beobachtet werden (40). In unseren Versuchen kam es unter einer reduzierten Expression von TMEM63C zu einer signifikant verminderten Phosphorylierung von Akt in hPC. Somit könnte TMEM63C über die Beeinflussung der Aktivität von Akt die Viabilität dieser Zellen beeinflussen. Welche Bedeutung die verminderte Aktivierung von Akt unter TMEM63C-Suppression in fibrotischen Prozessen hat, sollte jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Bedeutung von TMEM63C für die Zellviabilität und Apoptose

Schulz et al. beschrieben ein vermindertes Überleben von hPC sowie eine vermehrte Translokation von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol unter TMEM63C-Suppression (14). Diese Beobachtungen ließen sich in unseren Versuchen reproduzieren. Auch in HEK 293 führte die siRNA-vermittelte Hemmung der TMEM63C-Expression zu einer signifikant verringerten Viabilität dieser Zellen. Um die Relevanz von TMEM63C für das Zellüberleben in pathophysiologischen Prozessen besser einordnen zu können, untersuchten wir die Viabilität von hPC unter Ang II-Stimulation. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es unter erhöhten Ang II-Konzentrationen und einer gleichzeitigen Suppression von TMEM63C zu einem signifikanten Abfall der Zellviabilität kommt. Zusätzlich konnten wir einen signifikanten Anstieg proapoptotischer Prozesse in diesen Zellen nachweisen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass TMEM63C einen wichtigen protektiven Einfluss auf die Zellviabilität im Rahmen pathophysiologischer Prozesse besitzen könnte.

Insgesamt deuten diese ersten Funktionsanalysen von TMEM63C darauf hin, dass TMEM63C eine hohe Relevanz für das renale Zellüberleben sowie für den Erhalt der Nierenfunktion im Rahmen pathophysiologischer Prozesse haben könnte und bestätigen somit die Beobachtung von Schulz et al. aus dem Jahr 2019 (14).

4.3 Zusammenfassung

In unseren Versuchen wurde erstmalig die Steuerung der TMEM63C-Expression untersucht und erste Analysen zu möglichen Funktionen und der Bedeutung von TMEM63C für die Nierenfunktion durchgeführt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass miR-564 die Bildung von TMEM63C post-transkriptionell reguliert. Zudem wurde in unseren Versuchen nachgewiesen, dass die Expression von TMEM63C durch einflussreiche Mediatoren, welche eine tragende Rolle in pathophysiologischen Prozessen einnehmen, beeinflusst wird. So wurde ein signifikanter Anstieg von TMEM63C unter Ang II- bzw. TGF- β -Stimulation beobachtet. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Expression von TMEM63C durch den Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert wird. Schulz et al. vermuteten eine entscheidende Bedeutung von TMEM63C für die glomeruläre Filterfunktion und das Zellüberleben von Nierenzellen (14). In unseren Studien wurde nachgewiesen, dass TMEM63C die Expression wichtiger Proteine der Nierenfunktion wie Nephrin oder Akt beeinflusst. Zudem legen erste Versuche nahe, dass TMEM63C in den Prozess der interstitiellen Fibrose involviert sein könnte, indem es die Expression entscheidender Proteine der EMT beeinflusst. Außerdem zeigten unsere Experimente, dass es unter der verminderten Expression von

TMEM63C zu einem reduzierten Zellüberleben von HEK 293 und hPC, und zusätzlich zu einer Erhöhung proapoptotischer Prozesse in hPC kommt. Darüber hinaus sahen wir diesen Effekt auch unter Ang II-Stimulation, sodass die Vermutung nahe liegt, dass TMEM63C einen wichtigen protektiven Einfluss auf die Zellviabilität im Rahmen physiologischer sowie pathophysiologischer Prozesse besitzen könnte.

Die vorliegenden Daten geben erste Hinweise auf Regulationsmechanismen und mögliche Funktionen von TMEM63C im Rahmen pathophysiologisch relevanter Prozesse in humanen Nierenzellen. Allerdings sollten weitere Studien folgen, welche gezielt den Einfluss von TMEM63C auf zelluläre Effekte, wie auf Signalkaskaden oder Expressionskontrolle, untersuchen. Zudem sollten weitere Experimente in vivo geplant werden, um die Funktion von TMEM63C in pathophysiologischen Prozessen besser verstehen zu können.

Im Einklang mit den Ergebnissen von Schulz et al. stützen unsere Ergebnisse die Vermutung, dass TMEM63C einen protektiven Faktor im Rahmen pathologischer Prozesse in der Niere wie Inflammation oder Fibrose darstellt und so eine besondere Stellung im Erhalt der Nierenfunktion einnehmen könnte (14).

5. Literaturverzeichnis

1. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA*. 2019;322(13):1294-304.
2. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet*. 2017;389(10075):1238-52.
3. Xu Z, Li W, Han J, Zou C, Huang W, Yu W, Shan X, Lum H, Li X, Liang G. Angiotensin II induces kidney inflammatory injury and fibrosis through binding to myeloid differentiation protein-2 (MD2). *Scientific reports*. 2017;7:44911.
4. Ding H, Zhou Y, Huang H. MiR-101a ameliorates AngII-mediated hypertensive nephropathy by blockade of TGF β /Smad3 and NF- κ B signalling in a mouse model of hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2019;46(3):246-54.
5. Chinnakkannu P, Reese C, Gaspar JA, Panneerselvam S, Pleasant-Jenkins D, Mukherjee R, Baicu C, Tourkina E, Hoffman S, Kuppuswamy D. Suppression of angiotensin II-induced pathological changes in heart and kidney by the caveolin-1 scaffolding domain peptide. *PLoS one*. 2018;13(12):e0207844.
6. Reiser J, Altintas MM. Podocytes. *F1000Research*. 2016;5.
7. Podgorski P, Konieczny A, Lis L, Witkiewicz W, Hruby Z. Glomerular podocytes in diabetic renal disease. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2019;28(12):1711-5.
8. Brinkkoetter PT, Ising C, Benzing T. The role of the podocyte in albumin filtration. *Nature reviews Nephrology*. 2013;9(6):328-36.
9. Li X, Chuang PY, D'Agati VD, Dai Y, Yacoub R, Fu J, Xu J, Taku O, Premsrirut PK, Holzman LB, He JC. Nephric Podocytes Preserve Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(10):2361-77.
10. Wang J, Fu D, Senouthai S, You Y. Critical roles of PI3K/Akt/NF- κ B survival axis in angiotensin II-induced podocyte injury. *Mol Med Rep*. 2019;20(6):5134-44.
11. Zhang Y, Chen X, Yuan L, Zhang Y, Wu J, Guo N, Chen X, Liu J. Down-regulation of IRAK1 attenuates podocyte apoptosis in diabetic nephropathy through PI3K/Akt signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;506(3):529-35.
12. Cardoso VG, Gonçalves GL, Costa-Pessoa JM, Thieme K, Lins BB, Casare FAM, de Ponte MC, Camara NOS, Oliveira-Souza M. Angiotensin II-induced podocyte apoptosis is mediated by endoplasmic reticulum stress/PKC- δ /p38 MAPK pathway activation and through increased Na(+)/H(+) exchanger isoform 1 activity. *BMC nephrology*. 2018;19(1):179.
13. Zhao M, Bai M, Ding G, Zhang Y, Huang S, Jia Z, Zhang A. Angiotensin II Stimulates the NLRP3 Inflammasome to Induce Podocyte Injury and Mitochondrial Dysfunction. *Kidney Diseases*. 2018;4(2):83-94.
14. Schulz A, Müller NV, van de Lest NA, Eisenreich A, Schmidbauer M, Barysenka A, Purfürst B, Sporbert A, Lorenzen T, Meyer AM, Herlan L, Witten A, Rühle F, Zhou W, de Heer E, Scharpfenecker M, Panáková D, Stoll M, Kreutz R. Analysis of the genomic architecture of a complex trait locus in hypertensive rat models links Tmem63c to kidney damage. *eLife*. 2019;8:e42068.
15. Zhao X, Yan X, Liu Y, Zhang P, Ni X. Co-expression of mouse TMEM63A, TMEM63B and TMEM63C confers hyperosmolarity activated ion currents in HEK293 cells. *Cell biochemistry and function*. 2016;34(4):238-41.
16. Trionfini P, Benigni A. MicroRNAs as Master Regulators of Glomerular Function in Health and Disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017;28(6):1686-96.

17. Trionfini P, Benigni A, Remuzzi G. MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;11:23.
18. Chung AC, Lan HY. MicroRNAs in renal fibrosis. *Frontiers in physiology*. 2015;6:50.
19. Fan B, Jin Y, Zhang H, Zhao R, Sun M, Sun M, Yuan X, Wang W, Wang X, Chen Z, Liu W, Yu N, Wang Q, Liu T, Li X. MicroRNA21 contributes to renal cell carcinoma cell invasiveness and angiogenesis via the PDCD4/cJun (AP1) signalling pathway. *International journal of oncology*. 2019.
20. Gong X, Zhao H, Saar M, Peehl DM, Brooks JD. miR-22 Regulates Invasion, Gene Expression and Predicts Overall Survival in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Kidney cancer*. 2019;3(2):119-32.
21. Pan X, Quan J, Li Z, Zhao L, Zhou L, Jinling X, Weijie X, Guan X, Li H, Yang S, Gui Y, Lai Y. miR-566 functions as an oncogene and a potential biomarker for prognosis in renal cell carcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;102:718-27.
22. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002;13(3):630-8.
23. Inada M, Izawa G, Kobayashi W, Ozawa M. 293 cells express both epithelial as well as mesenchymal cell adhesion molecules. *International journal of molecular medicine*. 2016;37(6):1521-7.
24. Alique M, Civantos E, Sanchez-Lopez E, Lavoiz C, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Díez R, García-Redondo Ana B, Egido J, Ortiz A, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M, Ruiz-Ortega M. Integrin-linked kinase plays a key role in the regulation of angiotensin II-induced renal inflammation. *Clinical Science*. 2014;127(1):19-31.
25. Connor KL, Denby L. MicroRNAs as non-invasive biomarkers of renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2019.
26. Wei Q, Mi QS, Dong Z. The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. *IUBMB life*. 2013;65(7):602-14.
27. Khella HW, Bakhet M, Allo G, Jewett MA, Girgis AH, Latif A, Girgis H, Von Both I, Bjarnason GA, Yousef GM. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2013;34(10):2231-9.
28. Tusong H, Maolakuerban N, Guan J, Rexiati M, Wang WG, Azhati B, Nuerrula Y, Wang YJ. Functional analysis of serum microRNAs miR-21 and miR-106a in renal cell carcinoma. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2017;18(1):79-85.
29. Ying G, Wu R, Xia M, Fei X, He QE, Zha C, Wu F. Identification of eight key miRNAs associated with renal cell carcinoma: A meta-analysis. *Oncology letters*. 2018;16(5):5847-55.
30. Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, Terry AV, Jr., Nuovo GJ, Elton TS. Experimental validation of miRNA targets. *Methods (San Diego, Calif)*. 2008;44(1):47-54.
31. Riffo-Campos ÁL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12):1987.
32. Ru N, Zhang F, Liang J, Du Y, Wu W, Wang F, Liu X. MiR-564 is down-regulated in osteosarcoma and inhibits the proliferation of osteosarcoma cells via targeting Akt. *Gene*. 2018;645:163-9.
33. Mutlu M, Saatci O, Ansari SA, Yurdusev E, Shehwana H, Konu O, Raza U, Sahin O. miR-564 acts as a dual inhibitor of PI3K and MAPK signaling networks and inhibits proliferation and invasion in breast cancer. *Scientific reports*. 2016;6:32541.

34. Jiang C, Shen F, Du J, Hu Z, Li X, Su J, Wang X, Huang X. MicroRNA-564 is downregulated in glioblastoma and inhibited proliferation and invasion of glioblastoma cells by targeting TGF-beta1. *Oncotarget*. 2016;7(35):56200-8.
35. Xiao L, Tang T, Huang Y, Guo J. MiR-564 promotes hypertrophic scar via up-regulating TGF-beta1. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia*. 2017.
36. Argyropoulos C, Wang K, Bernardo J, Ellis D, Orchard T, Galas D, Johnson JP. Urinary MicroRNA Profiling Predicts the Development of Microalbuminuria in Patients with Type 1 Diabetes. *Journal of clinical medicine*. 2015;4(7):1498-517.
37. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *Journal of veterinary internal medicine*. 2019;33(2):363-82.
38. van der Meer IM, Cravedi P, Remuzzi G. The role of renin angiotensin system inhibition in kidney repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2010;3:7-.
39. Yang Q, Ma Y, Liu Y, Liang W, Chen X, Ren Z, Wang H, Singhal PC, Ding G. Angiotensin II down-regulates nephrin-Akt signaling and induces podocyte injury: role of c-Abl. *Molecular biology of the cell*. 2016;27(1):197-208.
40. Hu H, Hu S, Xu S, Gao Y, Zeng F, Shui H. miR-29b regulates Ang II-induced EMT of rat renal tubular epithelial cells via targeting PI3K/AKT signaling pathway. *International journal of molecular medicine*. 2018;42(1):453-60.
41. Bottinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002;13(10):2600-10.
42. Loeffler I, Wolf G. Transforming growth factor- β and the progression of renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014;29(suppl_1):i37-i45.
43. Gewin L, Zent R. How does TGF-beta mediate tubulointerstitial fibrosis? *Seminars in nephrology*. 2012;32(3):228-35.
44. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- β overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell and Tissue Research*. 2012;347(1):129-40.
45. Ying Q, Wu G. Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: an update. *Renal Failure*. 2017;39(1):474-83.
46. Wang M, Chen DQ, Wang MC, Chen H, Chen L, Liu D, Zhao H, Zhao YY. Poricoic acid ZA, a novel RAS inhibitor, attenuates tubulo-interstitial fibrosis and podocyte injury by inhibiting TGF- β /Smad signaling pathway. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2017;36:243-53.
47. Grande MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arévalo M, Rowe RG, Weiss SJ, López-Novoa JM, Nieto MA. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature Medicine*. 2015;21(9):989-97.
48. Liu BC, Tang TT, Lv LL, Lan HY. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney international*. 2018;93(3):568-79.
49. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology*. 2010;176(1):85-97.
50. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, Wu C-C, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T, Nischal H, Allison JP, Zeisberg M, Kalluri R. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nature Medicine*. 2015;21(9):998-1009.
51. Seccia TM, Caroccia B, Piazza M, Rossi GP. The Key Role of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Hypertensive Kidney Disease. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(14):3567.

52. Moustakas A, Heldin CH. Mechanisms of TGFbeta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(7).
 53. Du T, Zou X, Cheng J, Wu S, Zhong L, Ju G, Zhu J, Liu G, Zhu Y, Xia S. Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells reduce renal fibrosis through induction of native and foreign hepatocyte growth factor synthesis in injured tubular epithelial cells. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(3):59.
 54. May CJ, Saleem M, Welsh GI. Podocyte dedifferentiation: a specialized process for a specialized cell. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:148.
 55. Lin X, Jiang C, Luo Z, Qu S. Protective effect of erythropoietin on renal injury induced in rats by four weeks of exhaustive exercise. *BMC nephrology*. 2013;14:130.
 56. Yu L, Lin Q, Feng J, Dong X, Chen W, Liu Q, Ye J. Inhibition of nephrin activation by c-mip through Csk–Cbp–Fyn axis plays a critical role in Angiotensin II-induced podocyte damage. *Cellular Signalling*. 2013;25(3):581-8.
- [P1] Orphal M, Gillespie A, Böhme K, Subrova J, Eisenreich A, Kreutz R. TMEM63C, a potential novel target for albuminuria development, is regulated by microRNA-564 and transforming growth factor beta in human renal cells. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2020; 45(6):850-62.
- [P2] Eisenreich A, Orphal M, Böhme K, Kreutz R. Tmem63c is a potential pro-survival factor in angiotensin II-treated human podocytes. *Life Sciences*. 2020; 258:118175.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Miriam Orphal, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Erste Untersuchungen zur Regulation und Funktion von TMEM63C in humanen Nierenzellen“ bzw. „Initial studies on the regulation and function of TMEM63C in human kidney cells“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Miriam Orphal hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Miriam Orphal, Allan Gillespie, Karen Böhme, Jana Subrova, Andreas Eisenreich, Reinhold Kreutz

TMEM63C, a potential novel target for albuminuria development, is regulated by microRNA-564 and transforming growth factor beta in human renal cells

Kidney and Blood Pressure Research, 2020

Beitrag im Einzelnen:

- Laborarbeiten: Inkubation der Zellen, Stimulation/Transfektion, Kryokonservierung, Proteinextraktion aus Zellkultur (insbesondere für die Experimente in Fig. 1-7), Durchführung der Mehrzahl an PCRs und Western Blots (insbesondere für die Experimente in Fig. 1-3, 5-7)
- Auswertung der Daten und statistische Analyse
- Literaturrecherche
- Verfassung des Manuskripts

Publikation 2:

Andreas Eisenreich, Miriam Orphal, Karen Böhme, Reinhold Kreutz

Tmem63c is a potential pro-survival factor in angiotensin II-treated human podocytes

Life Sciences, 2020

Beitrag im Einzelnen:

- Laborarbeiten: Inkubation der Zellen, Stimulation/Transfektion, Kryokonservierung, Proteinextraktion aus Zellkultur, Mitarbeit an PCRs und Western Blots (insbesondere Durchführung Experiment in Fig. 2A)
- Diskussion der Daten
- Überarbeitung des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift Miriam Orphal

Druckexemplar Publikation 1: Auszug Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"UROLOGY and NEPHROLOGY"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 80 Journale

| Rank | Full Journal Title | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|--|-------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | Nature Reviews Nephrology | 5,767 | 19.684 | 0.017080 |
| 2 | EUROPEAN UROLOGY | 30,782 | 17.298 | 0.070930 |
| 3 | Nature Reviews Urology | 3,262 | 9.333 | 0.009550 |
| 4 | JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY | 38,177 | 8.547 | 0.055540 |
| 5 | KIDNEY INTERNATIONAL | 42,627 | 8.306 | 0.043340 |
| 6 | AMERICAN JOURNAL OF KIDNEY DISEASES | 23,401 | 6.653 | 0.030950 |
| 7 | Clinical Journal of the American Society of Nephrology | 16,951 | 6.243 | 0.032570 |
| 8 | Kidney International Supplements | 2,062 | 5.842 | 0.004680 |
| 9 | JOURNAL OF UROLOGY | 48,298 | 5.647 | 0.045970 |
| 10 | PROSTATE CANCER AND PROSTATIC DISEASES | 2,144 | 4.600 | 0.005380 |
| 11 | BJU INTERNATIONAL | 19,938 | 4.524 | 0.025070 |
| 12 | NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION | 25,423 | 4.198 | 0.029210 |
| 13 | JOURNAL OF NEPHROLOGY | 3,065 | 3.698 | 0.004370 |
| 14 | Journal of Sexual Medicine | 9,915 | 3.649 | 0.014910 |
| 15 | SEMINARS IN NEPHROLOGY | 2,881 | 3.629 | 0.004130 |
| 16 | AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-RENAL PHYSIOLOGY | 15,642 | 3.323 | 0.017660 |
| 17 | EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS | 666 | 3.121 | 0.000950 |
| 18 | CURRENT OPINION IN NEPHROLOGY AND HYPERTENSION | 3,228 | 3.013 | 0.005510 |

| Rank | Full Journal Title | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|---|-------------|-----------------------|-------------------|
| 19 | Clinical Kidney Journal | 2,055 | 2.975 | 0.005430 |
| 20 | AMERICAN JOURNAL OF NEPHROLOGY | 4,563 | 2.961 | 0.007110 |
| 21 | PROSTATE | 7,050 | 2.876 | 0.008980 |
| 22 | UROLOGIC ONCOLOGY- SEMINARS AND ORIGINAL INVESTIGATIONS | 5,169 | 2.863 | 0.014240 |
| 23 | ASIAN JOURNAL OF ANDROLOGY | 3,603 | 2.862 | 0.005600 |
| 24 | PEDIATRIC NEPHROLOGY | 8,796 | 2.816 | 0.010470 |
| 25 | WORLD JOURNAL OF UROLOGY | 5,203 | 2.761 | 0.010260 |
| 26 | JOURNAL OF RENAL NUTRITION | 2,000 | 2.750 | 0.002490 |
| 27 | ADVANCES IN CHRONIC KIDNEY DISEASE | 1,758 | 2.673 | 0.003610 |
| 28 | Aging Male | 860 | 2.500 | 0.000830 |
| 29 | Minerva Urologica E Nefrologica | 590 | 2.477 | 0.001010 |
| 30 | Clinical Genitourinary Cancer | 2,013 | 2.450 | 0.006480 |
| 31 | BLOOD PURIFICATION | 2,033 | 2.363 | 0.003100 |
| 32 | NEUROUROLOGY AND URODYNAMICS | 5,710 | 2.360 | 0.007140 |
| 33 | World Journal of Mens Health | 384 | 2.269 | 0.001110 |
| 34 | JOURNAL OF ENDOUROLOGY | 6,112 | 2.267 | 0.008060 |
| 35 | UROLOGIC CLINICS OF NORTH AMERICA | 1,875 | 2.245 | 0.002010 |
| 36 | CardioRenal Medicine | 517 | 2.214 | 0.001230 |
| 37 | KIDNEY & BLOOD PRESSURE RESEARCH | 1,664 | 2.123 | 0.002530 |
| 38 | Translational Andrology and Urology | 995 | 2.113 | 0.003310 |
| 39 | INTERNATIONAL JOURNAL OF UROLOGY | 3,888 | 2.107 | 0.005620 |

Selected JCR Year: 2018; Selected Categories: "UROLOGY and NEPHROLOGY"

Publikation 1

Miriam Orphal, Allan Gillespie, Karen Böhme, Jana Subrova, Andreas Eisenreich, Reinhold Kreutz

TMEM63C, a potential novel target for albuminuria development, is regulated by microRNA-564 and transforming growth factor beta in human renal cells

Kidney and Blood Pressure Research, 2020; 45(6):850-62.

<https://doi.org/10.1159/000508477>

Research Article

TMEM63C, a Potential Novel Target for Albuminuria Development, Is Regulated by MicroRNA-564 and Transforming Growth Factor beta in Human Renal Cells

Miriam Orphal Allan Gillespie Karen Böhme Jana Subrova
Andreas Eisenreich Reinhold Kreutz

Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, Berlin, Germany

Keywords

Transmembrane protein 63C · MicroRNA · Podocyte · Transforming growth factor beta · Epithelial-mesenchymal transition

Abstract

Introduction: Transmembrane protein (TMEM) 63C is a member of the TMEM gene family and was recently linked to glomerular filtration barrier function and albuminuria. Its molecular function and expression regulation are largely unknown. **Objective:** In this study, we set out to characterize the regulating impact of microRNAs (miRNAs) such as miRNA-564 (miR-564) on TMEM63C expression in renal cells. Also, we examined the influence of transforming growth factor beta (TGF- β) on TMEM63C expression and the potential impact of TMEM63C inhibition on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in renal cells and on cell viability in human embryonic kidney 293 cells (HEK 293). **Methods:** Expression analyses were done using real-time PCR and Western blot. Dual luciferase assay was performed to determine the miRNA-mediated expression control. Cell viability was assessed via trypan blue exclusion staining. **Results and Conclusions:** MiR-564 reduced TMEM63C expression in HEK 293 and human podocytes (hPC). The treatment of renal cells with TGF- β led to an increased expression of TMEM63C. Moreover, a reduced TMEM63C expression was associated with a changed ratio of EMT marker proteins such as α -smooth muscle actin versus E-cadherin in HEK 293 and

Andreas Eisenreich and Reinhold Kreutz contributed equally.

Reinhold Kreutz
Department for Toxicology and Pharmacology, Charité University Berlin
Charitéplatz 1
DE-10117 Berlin (Germany)
reinhold.kreutz@charite.de

decreased nephrin expression in hPC. In addition, cell viability was reduced upon inhibition of TMEM63C expression in HEK 293. This study demonstrates first mechanisms involved in TMEM63C expression regulation and a link to EMT in renal cells.

© 2020 The Author(s).
Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

Podocytes are terminally differentiated and highly specialized glomerular cells with a great importance for the glomerular filtration barrier (GFB) [1]. In this context, nephrin is known as an essential structural protein of the slit diaphragm and is considerably involved in the preservation of glomerular function as well as podocyte viability [2]. The injury or loss of podocytes leads to albuminuria and plays a pivotal role in several glomerular diseases including diabetic and non-diabetic kidney diseases [3, 4]. While albuminuria itself represents a marker of renal damage, it also has a direct pathogenic effect on renal tissue [5, 6]. Therefore, albuminuria is discussed as suitable therapeutic target for intervention to slow the progression of CKD [5].

Recently, a study identified transmembrane protein (TMEM) 63C as a novel candidate for albuminuria development [7]. TMEM63C, a member of the TMEM gene family, is expressed in the kidney, but also in many other tissues such as the cerebral cortex and endocrine tissues [7]. Schulz et al. [7] showed a loss of TMEM63C expression in podocytes of patients with focal segmental glomerulosclerosis. In addition, functional studies in zebra fish models suggested that TMEM63C could play an important role in GFB function [7]. Nevertheless, the biological function of TMEM63C and its expression regulation are widely unknown.

MicroRNAs (miRNAs) are short, non-coding RNAs consisting of 20–22 nucleotides, which are known to be influential regulators of post-transcriptional gene expression [8]. The regulation and function of miRNAs are subject of current research. In this context, previous studies described a major influence of miRNAs on kidney diseases [8–10]. For example, miRNA-21 (miR-21), miR-29, and miR-192 were found to play a pathophysiological role in renal fibrosis induced by transforming growth factor beta (TGF- β) [10]. Furthermore, the regulating effect of miRNAs becomes more important in cancer research. In this regard, the impact of several miRNAs, such as miR-21, miR-22, and miR-566, were described in the pathogenesis of renal cell cancer [11–13].

This study sets out to characterize the post-transcriptional regulation of TMEM63C expression by miRNAs including miR-30b and miR-564 in renal cells. Moreover, we analyzed the impact of small interfering RNA (siRNA)-mediated TMEM63C inhibition on cell viability. In addition, the effect of TGF- β on TMEM63C regulation and the impact of TMEM63C deficiency on epithelial-mesenchymal transition (EMT) were analyzed in cell culture studies.

Methods

Cell Culture

Human podocytes (hPC; supplied by Dr. M. Saleem, University of Bristol, Bristol, UK) were cultured and differentiated as described previously [14]. For our investigations, we not only used hPC, but also human embryonic kidney 293 cells (HEK 293) due to its high transfection efficiency and as suitable model to study epithelial characteristics in kidney cells. HEK 293 (a kind gift of Prof. Dr. H. Fechner, Technical University of Berlin, Berlin, Germany) were cultured in DMEM enriched with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin – all provided by Biochrom GmbH, Berlin, Germany. HEK 293 were grown in a humidified incu-

Table 1. The primer sequences of real-time PCR

| Gene | Primer sequences (5'→3') |
|-------------------|--------------------------|
| <i>TMEM63C</i> | |
| Forward | CAAGCGTGTCGGTAAGGATT |
| Reverse | ACAATTGGGTTCTGCAGCTT |
| <i>GAPDH</i> | |
| Forward | GAGTCAACGGATTTGGTCGT |
| Reverse | GATCTCGCTCCTGGAAGATG |
| <i>Nephrin</i> | |
| Forward | ATCCTCTCCATCCTGGTTCC |
| Reverse | GTCCTGGAGGGAACAGAACA |
| <i>E-cadherin</i> | |
| Forward | ACATTTCCCAACTCCTCTCC |
| Reverse | TCTGTACCTTCAGCCATC |
| α -SMA | |
| Forward | CGAAGCACAGAGCAAAAGAG |
| Reverse | AGGCATAGAGAGACAGCACCG |

bator at 37°C and with 5% CO₂. Before transfection, HEK 293 and hPC were starved in fetal bovine serum-free DMEM or RPMI 1640, respectively. 200 nM of miR-30b, miR-564, or negative control (miRControl) miRNA mimic was used for miRNA transfection. For siRNA transfection, 200 nM of TMEM63C siRNAs (siTMEM63C) or scrambled control siRNAs (siControl) were deployed. Transfection was done by using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). The inhibitory effect of siTMEM63C was examined on mRNA and protein levels. For stimulation, hPC and HEK 293 were treated with 5 and 10 ng/mL TGF- β (eBioscience; Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, USA), respectively, for 48 h. Transfection efficiency, determined by Dy547 transfection control (200 nmol/L; Fisher Scientific – Germany GmbH, Schwerte, Germany), was determined to be 25% in hPC [14] and 62% in HEK 293.

Real-Time PCR

Analyses of mRNA expression were performed as described previously [14]. Specific TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) were utilized for determination of TMEM63C, nephrin, α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression, following the manufacturer's instructions. Real-time PCR was accomplished by means of 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using the following conditions: 50°C, 2 min; 95°C, 20 s; 45 cycles 95°C, 3 s; 60°C, 30 s. The PCR primers used are shown in Table 1.

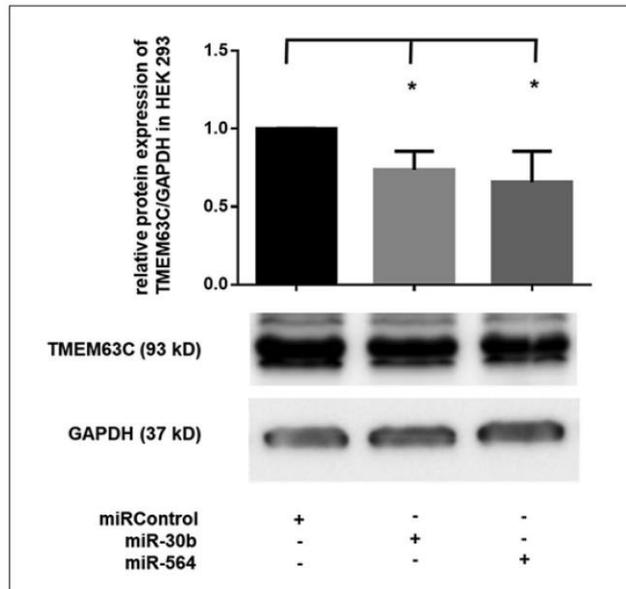
Western Blotting

Western blot analyses were done as described previously [15]. Specific antibodies against TMEM63C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Calbiochem, Darmstadt, Germany) were used for detection. Blots were visualized and quantified by using FUSION FX7 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) and Gel-Pro Analyser software version 4.0.00.001 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

Dual Luciferase Activity Assay

For determination of dual luciferase activity, 2×10^4 HEK 293 were treated with miR-30b, miR-564, or miRControl in 96-well plates. Cells were co-transfected with aforementioned

Fig. 1. The impact of miR-30b and miR-564 on TMEM63C protein expression in HEK 293. The protein expression of TMEM63C in HEK 293 transfected with miR-30b, miR-564, or a negative control miRNA mimic (miRControl) is depicted. The expression was analyzed after 48 h. GAPDH was used for normalization. Shown is the mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. (*) $p < 0.05$. miR, miRNA; TMEM63C, transmembrane protein 63C; HEK 293, human embryonic kidney cells 293; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



miRNAs and 200 ng/mL dual luciferase reporter vector (3'UTR-TMEM63C vec) containing the 3'-untranslated region (3'UTR) of TMEM63C, a reporter vector (3'UTR-TMEM63C-mut vec) containing a mutated miRNA binding site in the 3'UTR of TMEM63C or a negative control vector (control vec), respectively (provided by GeneCopoeia, Inc., Rockville, MD, USA). After 24 h, dual luciferase activity was analyzed by using a luciferase reporter assay (Promega GmbH, Mannheim, Germany) following the manufacturer's protocol.

Cell Viability Assay

Cell viability was determined by a trypan blue staining assay. In brief, HEK 293 were seeded in 12-well plates and transfected with 200 nM siTMEM63C or siControl, as described previously. After 48 h, cells were removed from the wells using trypsin-EDTA and subsequently resuspended in fresh DMEM. 10 μ L of cell suspension was mixed with 90 μ L of trypan blue solution (Biochrom GmbH, Berlin, Germany). Eventually, living and trypan blue-stained dead cells were counted using a C-Chip Neubauer improved hemocytometer chamber (Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe, Germany).

Statistical Analysis

All results were represented as mean \pm standard error the mean (SEM) and analyzed by Student's *t* test or one-way ANOVA. A probability value (p) < 0.05 was deemed as significant.

Results

Impact of Different miRNAs on TMEM63C Expression in HEK 293

First, we performed in silico analysis to identify potential miRNAs modulating TMEM63C expression on post-transcriptional level. In our analysis, we searched relevant databases, such as TargetScanHuman 7.1 (www.targetscan.org), miRDB (www.mirdb.org), and Diana

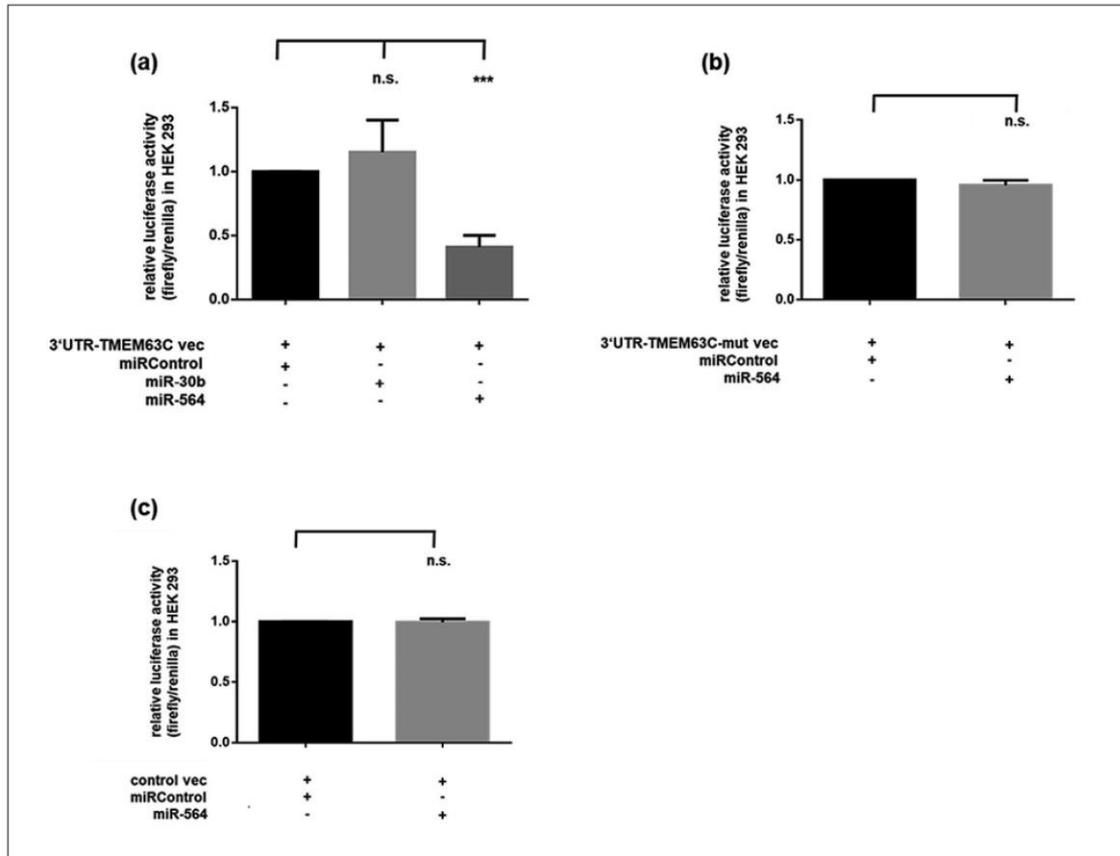


Fig. 2. The influence of miR-30b and miR-564 on luciferase activity in HEK 293. Shown is the luciferase activity in HEK 293 transfected with **(a)** luciferase reporter construct containing 3'UTR of TMEM63C (3'UTR-TMEM63C vec) and co-transfected with miR-30b, miR-564, or a negative control miRNA mimic (miRControl). For control, HEK 293 were co-transfected with **(b)** control vector (3'UTR-TMEM63C-mut vec), containing a mutated miRNA binding site in the 3'UTR of TMEM63C, and **(c)** a non-functional control vector (control vec), respectively. Firefly luciferase activity was determined 24 h after transfection and normalized against renilla luciferase activity. In **a, b, c**, the mean \pm SEM of at least 3 independent experiments is shown. (***) $p < 0.001$. n.s., no significant difference; miR, miRNA; HEK 293, human embryonic kidney cells 293; 3'UTR, 3'-untranslated region; TMEM63C, transmembrane protein 63C.

Tools (www.diana.imis.athena-innovation.gr). All of the abovementioned prediction tools revealed miR-30b and miR-564 as potential candidates for TMEM63C expression regulation via binding to the 3'UTR of TMEM63C mRNA. To examine the effect of the potential miRNA candidates on TMEM63C expression, we used respective miRNA mimics in our experiments. Next, we determined the influence of the aforementioned miRNAs on protein expression of TMEM63C in HEK 293. In our experiments, miR-30b and miR-564 led to a decreased protein generation of TMEM63C after 48 h (Fig. 1).

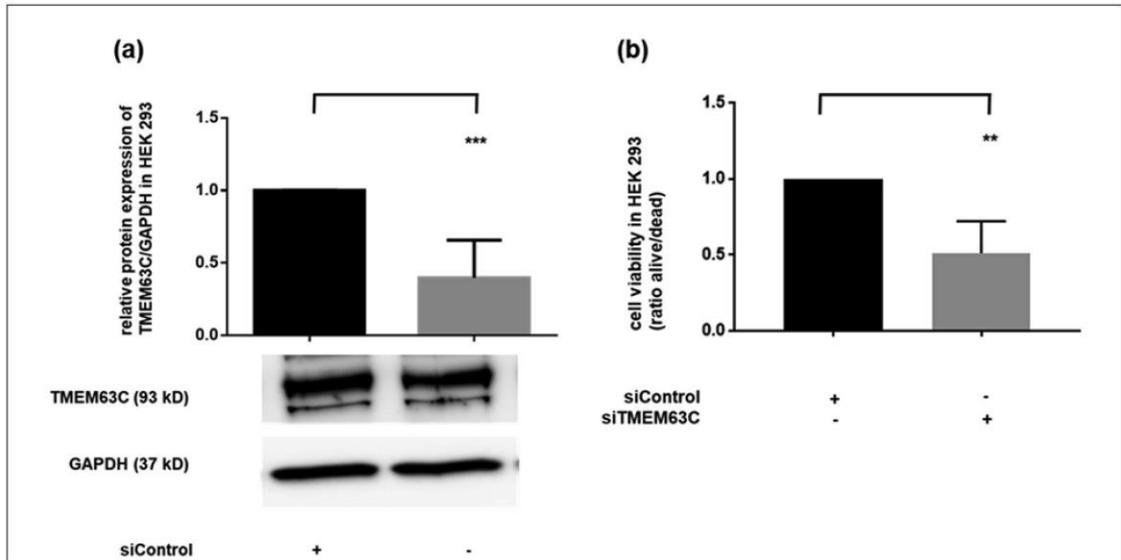


Fig. 3. The impact of TMEM63C inhibition on cell viability in HEK 293. HEK 293 were treated with specific siRNAs against TMEM63C (siTMEM63C) or scrambled control siRNAs (siControl) for 48 h. Shown is the (a) protein expression of TMEM63C and the (b) cell viability of HEK 293. The mean \pm SEM of at least 3 independent experiments is represented. (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$. TMEM63C, transmembrane protein 63C; HEK 293, human embryonic kidney cells 293; siRNA, small interfering RNA.

Relative Luciferase Activity Measurement in HEK 293

Compared to controls, co-transfection of cells with the TMEM63C reporter vector and miR-564 led to a reduced luciferase activity, whereas co-transfection with a TMEM63C reporter vector including a mutated 3'UTR binding site and miR-564 exhibited no significant difference in luciferase activity (Fig. 2a, b). In contrast, co-treatment of HEK 293 with the reporter construct and miR-30b had no significant impact on luciferase activity in relation to controls (Fig. 2a).

Cell Viability of HEK 293 Was Decreased by siRNA-Mediated Inhibition of TMEM63C

After 48 h, we observed a significant reduction of TMEM63C protein expression in siTMEM63C-treated cells (Fig. 3a). Compared to controls, cell viability was also significantly reduced in siTMEM63C-transfected HEK 293 after 48 h (Fig. 3b).

TGF- β Stimulation Increased TMEM63C Protein Expression in HEK 293

We analyzed the impact of TGF- β stimulation on TMEM63C expression in HEK 293 after 48 h. Compared to controls, treatment of the cells with TGF- β increased TMEM63C expression on protein level in a concentration-dependent manner (Fig. 4).

The Ratio of α -SMA versus E-Cadherin Was Affected by TMEM63C Expression

To investigate the impact of TMEM63C on EMT, we transfected HEK 293 with specific siRNAs against TMEM63C for 48 h and analyzed the ratio of α -SMA versus E-cadherin mRNA expression. Compared to controls, the ratio of α -SMA versus E-cadherin increased significantly in siTMEM63C-treated cells (Fig. 5).

Fig. 4. The effect of TGF- β stimulation on TMEM63C protein expression in HEK 293. HEK 293 were stimulated with 5 or 10 ng/mL TGF- β for 48 h. TMEM63C was normalized against GAPDH. The mean \pm SEM of at least 3 independent experiments is shown. (*) $p < 0.05$. n.s., no significant difference; TGF- β , transforming growth factor beta; TMEM63C, transmembrane protein 63C; HEK 293, human embryonic kidney cells 293; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

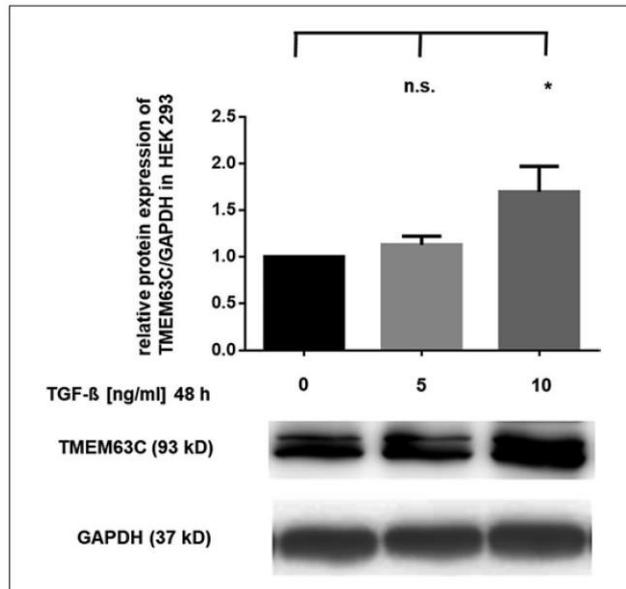
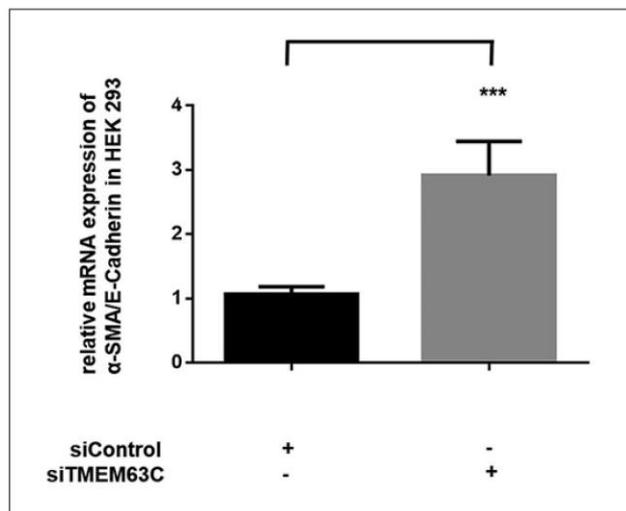


Fig. 5. The effect of TMEM63C inhibition on α -SMA versus E-cadherin. HEK 293 were transfected with inhibitory siRNAs against TMEM63C (siTMEM63C) or nonsense control siRNAs (siControl) for 48 h. Shown is the ratio of mRNA expression of α -SMA versus E-cadherin normalized against GAPDH. The mean \pm SEM of at least 3 independent experiments is represented. (***) $p < 0.001$. TMEM63C, transmembrane protein 63C; α -SMA, α -smooth muscle actin; HEK 293, human embryonic kidney cells 293; siRNA, small interfering RNA.



MiR-564 Decreased TMEM63C Expression in hPC

In addition to the experiments in HEK 293, we analyzed the impact of miR-564 on TMEM63C expression in hPC. Compared to controls, TMEM63C mRNA expression was significantly reduced in miR-564-transfected cells after 48 h (Fig. 6).

TGF- β Stimulation Increased TMEM63C Protein Expression in hPC

Subsequently, we investigated the impact of TGF- β on TMEM63C expression in hPC. Compared to controls, the treatment of the cells with 5 or 10 ng/mL TGF- β for 48 h increased TMEM63C expression on protein level in a concentration-dependent manner (Fig. 7).

Fig. 6. The effect of miR-564 on TMEM63C mRNA expression in hPC. Shown is the expression of TMEM63C mRNA in hPC. Cells were transfected with miR-564 or a negative control miRNA mimic (miRControl). The expression was analyzed after 48 h. GAPDH was used for normalization. The mean \pm SEM of at least 3 independent experiments is shown. (***) $p < 0.001$. miR, miRNA; TMEM63C, transmembrane protein 63C; hPC, human podocytes; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

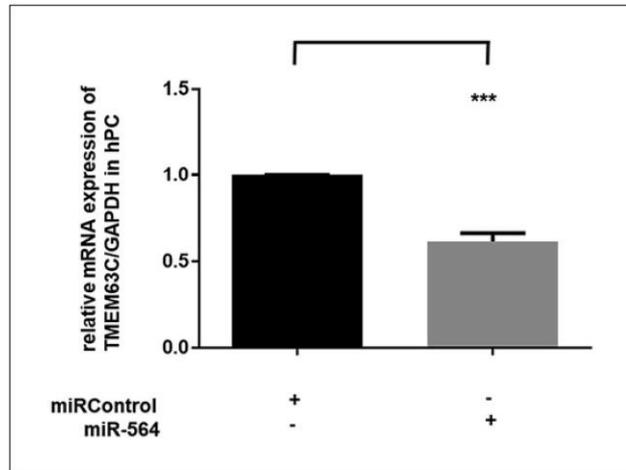
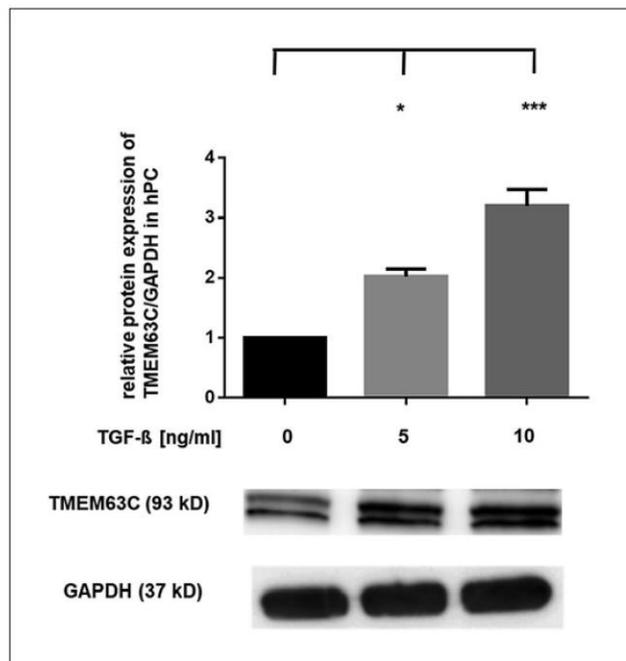


Fig. 7. The effect of TGF- β stimulation on TMEM63C protein expression in hPC. hPC were stimulated with 5 and 10 ng/mL TGF- β for 48 h, respectively. TMEM63C was normalized against GAPDH. The mean \pm SEM of at least 3 independent experiments is shown. (*) $p < 0.05$; (***) $p < 0.001$. TGF- β , transforming growth factor beta; TMEM63C, transmembrane protein 63C; hPC, human podocytes; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



Expression of Nephrin Was Reduced by siRNA-Mediated Inhibition of TMEM63C in hPC

Moreover, we studied the impact of TMEM63C expression on nephrin generation in hPC. Transfection of cells with TMEM63C-specific siRNAs led to a significant reduction of TMEM63C mRNA expression in hPC (Fig. 8a). Compared to controls, siRNA-mediated downregulation of TMEM63C was additionally associated with a significant decrease in nephrin expression on mRNA level after 48 h (Fig. 8b).

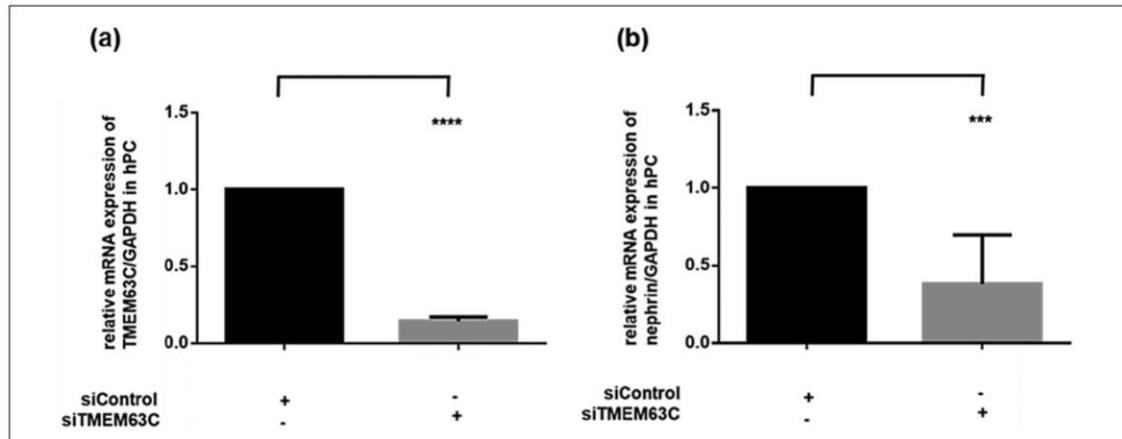


Fig. 8. TMEM63C and nephrin expression in siTMEM63C-treated hPC. hPC were transfected with inhibitory siRNAs against TMEM63C (siTMEM63C) or nonsense control siRNAs (siControl) for 48 h. Shown is the mRNA expression of **(a)** TMEM63C and **(b)** nephrin. The mean \pm SEM of at least 3 independent experiments is represented. (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$. TMEM63C, transmembrane protein 63C; hPC, human podocytes; siRNA, small interfering RNA.

Discussion

In this study, we identified TMEM63C as a direct target of miR-564. Furthermore, we showed an association between TMEM63C deficiency and reduced cell viability. Moreover, TMEM63C expression was found to be modulated by TGF- β stimulation in kidney cells. In addition to previous data [7], our data indicate that TMEM63C could be involved not only in GFB function but also in EMT.

Post-transcriptional Regulation of TMEM63C Expression by miR-564

We investigated the role of miRNAs in the regulation of TMEM63C expression. In a first step, we performed in silico analysis to identify potential miRNAs modulating TMEM63C expression on post-transcriptional level. In silico analysis is based on different computational algorithms, which are using different parameters to predict the probability of a functional miRNA binding site within a given mRNA target [16]. However, the characterization of miRNA-mRNA interactions is challenging and difficult to predict [17]. For this reason, several miRNAs were predicted to regulate TMEM63C expression. For our in vitro experiments, we selected miR-30b and miR-564 as very likely candidates for TMEM63C regulation. Both were predicted by at least 3 different prediction tools. In this study, we showed a direct reduction of TMEM63C expression by miR-564 treatment in renal cells, while miR-30b inhibited TMEM63C possibly rather indirectly. Both miRNAs were shown to be expressed in kidney cells [18].

Some miRNAs are already known to be significant participants in renal pathologies, such as miR-21 or miR-192 in kidney fibrosis [10]. In addition, previous studies described a modulating influence of miRNAs, such as miR-21, miR-22, or miR-566, in the genesis or prevention of renal cell cancer [11–13]. So far, miR-564 has not been identified in the context of renal pathologies, but various studies reported on the relevance of miR-564 and its function in different cancer biology. In this regard, miR-564 was demonstrated to induce cell apoptosis and to suppress cell proliferation in osteosarcoma cells by targeting protein kinase B [19].

Mutlu et al. [20] showed an inhibitory effect of miR-564 on cell proliferation in breast cancer cells due to suppression of phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase. In addition, ectopic expression of miR-564 was described to stop EMT and reduce the migration and invasion of breast cancer cells [20]. In further studies, miR-564 was found to modulate TGF- β in different cell types [21, 22]. Jiang et al. [21] showed that miR-564 reduced TGF- β expression in glioblastoma cells. In another experimental setting, Xiao and Colleagues [22] presented an upregulation of miR-564 to be associated with an increased TGF- β expression in hypertrophic scars. So far, the role of miR-564 in the kidney, and especially in the context of renal pathologies, is unknown. However, miR-564 and its regulative function on TGF- β and EMT may not only be important in cancer, but could also be relevant in the modulation of renal fibrosis. In our study, miR-564 suppressed the expression of TMEM63C. For this reason, we investigated the effects of reduced TMEM63C expression on renal cells and studied the impact of TGF- β on TMEM63C expression.

Expression Regulation and Functional Effects of TMEM63C in HEK 293

Schulz et al. [7] showed the importance of TMEM63C expression for the maintenance of GFB in zebra fish models and demonstrated its potential relevance in patients with focal segmental glomerulosclerosis in translational studies. However, until now, the expression regulation of TMEM63C is widely unexplored. In our experiments, we used HEK 293 – due to its high transfection efficiency – to examine the expression regulation and impact of TMEM63C. The recent report already showed impaired cell viability due to suppression of TMEM63C in hPC [7]. In our study, we found downregulation of TMEM63C to be associated with reduced viability also in other renal cells (HEK 293). These results suggest that TMEM63C may have a beneficial effect on renal cell survival. Next, we analyzed the impact of TGF- β on TMEM63C expression. TGF- β is known as regulator and initiator of EMT and has been described as key mediator of glomerular and tubulointerstitial pathobiology in CKD [23, 24]. In CKD, TGF- β led to tubulointerstitial fibrosis and dysfunction of podocytes [25]. Previous studies showed that miR-564 is involved in the regulation of TGF- β [21, 22]. In this study, we found TGF- β to affect TMEM63C expression in a concentration-dependent manner. Further, we observed an inhibiting effect of miR-564 on TMEM63C generation. For this reason, we also studied the potential role of TMEM63C in EMT. In EMT, cells lose progressively their epithelial characteristics and acquire markers of mesenchymal phenotype [26]. Therefore, the ratio of epithelial and mesenchymal marker proteins is changed [27]. Typical epithelial markers are E-cadherin and fibronectin, whereas typical mesenchymal proteins are N-cadherin, α -SMA, and vimentin [27]. HEK 293 were shown to express both epithelial and mesenchymal marker proteins [28]. Therefore, we used these cells as suitable model to study the change of epithelial characteristics by altered TMEM63C expression. We found reduced TMEM63C expression to be associated with an increased ratio of α -SMA versus E-cadherin in HEK 293. This changing ratio of α -SMA versus E-cadherin is discussed as an indicator for tubular EMT [29]. However, the precise role of TMEM63C in EMT of renal tubular epithelial cells remains uncertain and should be investigated in further experiments. In conclusion, we found siTMEM63C to reduce cell viability in HEK 293. In addition, we showed an association between reduced TMEM63C expression and a changing expression of proteins that are involved in EMT. Therefore, the increased expression of TMEM63C by TGF- β might reflect a potential protective mechanism of TMEM63C in renal cells under pathophysiological conditions, such as the development of renal fibrosis.

Expression Regulation and Functional Effects of TMEM63C in hPC

Similar to HEK 293, TGF- β treatment increased TMEM63C expression in a concentration-dependent manner in hPC. Enhanced TGF- β concentration is associated with podocyte apoptosis and detachment from the glomerular basement membrane, EMT, and the development

of glomerulosclerosis [30]. For EMT studies in podocytes, it is important to consider that these cells have been described as atypical epithelial cells with a different expression of epithelial and mesenchymal proteins [31]. EMT in podocytes, also referred to as “podocyte disease transformation,” is associated with a decrease in proteins such as podocin, nephrin, and P-cadherin and an increase in α -SMA and N-cadherin [31, 32]. Moreover, Ghiggeri et al. [33] indicated that nephrin elimination may trigger EMT in hPC. We showed that reduced TMEM63C expression is associated with decreased generation of nephrin in hPC. These data support our suspicion that TMEM63C may play a potential role in modulation of EMT in renal cells. Further, nephrin is known as an essential structural protein of the slit diaphragm and is pivotal for the preservation of GFB function as well as podocyte viability [2]. Langham et al. [34] also showed reduced nephrin expression to be associated with proteinuria in relevant kidney diseases such as diabetic nephropathy. We found reduced nephrin expression by inhibiting TMEM63C. For this reason, the current data support our previous observations linking TMEM63C to the development of albuminuria [7]. Altogether, our results demonstrated that TMEM63C is regulated by miR-564 and TGF- β in hPC and affects the expression of nephrin and could therefore influence the preservation of renal filter function.

Conclusion

In this study, we identified TMEM63C as a direct target of miR-564 in human renal cells. Moreover, the current study demonstrated that TMEM63C is regulated by TGF- β and could be involved in EMT. However, the effects of TMEM63C on EMT have not yet been clarified and should be investigated in further experiments. These experiments may include *in vivo* studies or at least studies in primary kidney cells, since experiments in immortalized cell lines, although important for mechanistic studies, should be viewed with some caution due to a potential permissive oncogenic phenotype for EMT studies [35]. Moreover, the role of EMT *per se* in the context of renal fibrosis has been questioned [36] and has been a matter of controversy [37]. Nevertheless, more recent studies indicated that at least partial EMT may be sufficient to promote renal fibrosis [38, 39] although evidence for human CKD is scant [37].

Our current results also support recently reported findings linking TMEM63C-expression to GFB function and albuminuria [7]. In the latter study, downregulation of TMEM63C resulted in albuminuria in zebra fish models and reduced cell viability of hPC, indicating a potential protective effect of TMEM63C for renal filter function [7]. In line with these findings, the current study showed siTMEM63C to reduce nephrin, a pivotal protein for the preservation of GFB function as well as podocyte viability [2]. Moreover, siRNA-mediated downregulation of TMEM63C led to a reduced cell viability of HEK 293. On the other hand, downregulation of TMEM63C in HEK 293 was linked to EMT by increasing the α -SMA/E-cadherin ratio and was thus associated with the activation of pro-fibrotic mechanisms [37]. In this regard, our finding demonstrating an upregulation of TMEM63C by TGF- β , which is a major driver of renal fibrosis, may reflect a counter-balancing mechanistic link between TMEM63C and TGF- β . Taken together, our data indicate that TMEM63C is not only linked to GFB function but may also be involved in EMT control. Therefore, TMEM63C is a novel functional candidate with potential impact for the development and progression of CKD.

Acknowledgements

We thank Claudia Plum, Petra Karsten, Sarah Podlech, Dr. Anja Brehm, and Marie Käbel for experimental and technical support.

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

This study was supported by the DFG (German Research Foundation) – Project number 394046635-SFG 1365 and the Open Access Publication Funds of Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Author Contributions

M.O., A.G., J.S., K.B., and A.E. carried out the cell culture studies. K.B., M.O., and A.E. participated in the PCR tests. M.O. and A.E. performed the statistical analysis. M.O., A.E., and R.K. conceived the study, participated in its design and coordination, and drafted the manuscript. A.G., J.S., and K.B. revised the manuscript critically. All authors read and approved the final manuscript. All authors agree to be accountable for all aspects of the work and to ensure that questions relating to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

TMEM63C, transmembrane protein 63C; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; α -SMA, α -smooth muscle actin.

References

- 1 Reiser J, Sever S. Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. *Annu Rev Med*. 2013;64:357–66.
- 2 Li X, Chuang PY, D'Agati VD, Dai Y, Yacoub R, Fu J, et al. Nephin preserves podocyte viability and glomerular structure and function in adult kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(10):2361–77.
- 3 Podgorski P, Konieczny A, Lis L, Witkiewicz W, Hruby Z. Glomerular podocytes in diabetic renal disease. *Adv Clin Exp Med*. 2019;28(12):1711–5.
- 4 Brinkkoetter PT, Ising C, Benzinger T. The role of the podocyte in albumin filtration. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(6):328–36.
- 5 Lambers Heerspink HJ, Gansevoort RT. Albuminuria is an appropriate therapeutic target in patients with CKD: the pro view. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(6):1079–88.
- 6 Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(11):2974–84.
- 7 Schulz A, Müller NV, van de Lest NA, Eisenreich A, Schmidbauer M, Barysenka A, et al. Analysis of the genomic architecture of a complex trait locus in hypertensive rat models links *Tmem63c* to kidney damage. *eLife*. 2019;8:e42068.
- 8 Trionfini P, Benigni A. MicroRNAs as master regulators of glomerular function in health and disease. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(6):1686–96.
- 9 Trionfini P, Benigni A, Remuzzi G. MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;11(1):23.
- 10 Chung AC, Lan HY. MicroRNAs in renal fibrosis. *Front Physiol*. 2015;6:50.
- 11 Fan B, Jin Y, Zhang H, Zhao R, Sun M, Sun M, et al. MicroRNA21 contributes to renal cell carcinoma cell invasiveness and angiogenesis via the PDCD4/cJun (AP1) signalling pathway. *Int J Oncol*. 2020 Jan;56(1):178–92.
- 12 Gong X, Zhao H, Saar M, Peehl DM, Brooks JD. miR-22 regulates invasion, gene expression and predicts overall survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Kidney Cancer*. 2019;3(2):119–32.
- 13 Pan X, Quan J, Li Z, Zhao L, Zhou L, Jinling X, et al. miR-566 functions as an oncogene and a potential biomarker for prognosis in renal cell carcinoma. *Biomed Pharmacother*. 2018;102:718–27.
- 14 Eisenreich A, Langer S, Herlan L, Kreutz R. Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its antiapoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes. *J Hypertens*. 2016;34(2):323–31.
- 15 Leppert U, Gillespie A, Orphal M, Böhme K, Plum C, Nagorsen K, et al. The impact of α -lipoic acid on cell viability and expression of nephrin and ZNF580 in normal human podocytes. *Eur J Pharmacol*. 2017;810:1–8.

- 16 Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, Terry AV Jr., Nuovo GJ, Elton TS. Experimental validation of miRNA targets. *Methods*. 2008;44(1):47–54.
- 17 Riffo-Campos AL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose? *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):1987.
- 18 Argyropoulos C, Wang K, Bernardo J, Ellis D, Orchard T, Galas D, et al. Urinary microRNA profiling predicts the development of microalbuminuria in patients with type 1 diabetes. *J Clin Med*. 2015;4(7):1498–517.
- 19 Ru N, Zhang F, Liang J, Du Y, Wu W, Wang F, et al. MiR-564 is down-regulated in osteosarcoma and inhibits the proliferation of osteosarcoma cells via targeting Akt. *Gene*. 2018;645:163–9.
- 20 Mutlu M, Saatci Ö, Ansari SA, Yurdusev E, Shehwana H, Konu Ö, et al. miR-564 acts as a dual inhibitor of PI3K and MAPK signaling networks and inhibits proliferation and invasion in breast cancer. *Sci Rep*. 2016;6:32541.
- 21 Jiang C, Shen F, Du J, Hu Z, Li X, Su J, et al. MicroRNA-564 is downregulated in glioblastoma and inhibited proliferation and invasion of glioblastoma cells by targeting TGF- β 1. *Oncotarget*. 2016;7(35):56200–8.
- 22 Xiao L, Tang T, Huang Y, Guo J. MiR-564 promotes hypertrophic scar via up-regulating TGF- β 1. *G Ital Dermatol Venereol*. 2019 Apr;154(2):186–91.
- 23 Bottinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(10):2600–10.
- 24 Loeffler I, Wolf G. Transforming growth factor- β and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(Suppl 1):i37–45.
- 25 Gewin L, Zent R. How does TGF- β mediate tubulointerstitial fibrosis? *Semin Nephrol*. 2012;32(3):228–35.
- 26 Seccia T, Carocchia B, Piazza M, Rossi GP. The key role of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in hypertensive kidney disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(14):3567.
- 27 Moustakas A, Heldin CH. Mechanisms of TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Med*. 2016;5(7):63.
- 28 Inada M, Izawa G, Kobayashi W, Ozawa M. 293 cells express both epithelial as well as mesenchymal cell adhesion molecules. *Int J Mol Med*. 2016;37(6):1521–7.
- 29 Du T, Zou X, Cheng J, Wu S, Zhong L, Ju G, et al. Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells reduce renal fibrosis through induction of native and foreign hepatocyte growth factor synthesis in injured tubular epithelial cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):59.
- 30 Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- β overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Res*. 2012;347(1):129–40.
- 31 May CJ, Saleem M, Welsh GI. Podocyte dedifferentiation: a specialized process for a specialized cell. *Front Endocrinol*. 2014;5:148.
- 32 Ying Q, Wu G. Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: an update. *Ren Fail*. 2017;39(1):474–83.
- 33 Ghiggeri GM, Gigante M, Di Donato A. Constitutional nephrin deficiency in conditionally immortalized human podocytes induced epithelial-mesenchymal transition, supported by beta-catenin/NF-kappa B activation: a consequence of cell junction impairment? *Inter J Nephrol*. 2013;2013:457490.
- 34 Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthöfer H, Zaoui P, et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia*. 2002;45(11):1572–6.
- 35 Wang Y, Chen S, Yan Z, Pei M. A prospect of cell immortalization combined with matrix microenvironmental optimization strategy for tissue engineering and regeneration. *Cell Biosci*. 2019;9(1):7.
- 36 Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, et al. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol*. 2010;176(1):85–97.
- 37 Liu BC, Tang TT, Lv LL, Lan HY. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2018;93(3):568–79.
- 38 Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med*. 2015;21(9):998–1009.
- 39 Grande MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arévalo M, et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med*. 2015;21(9):989–97.

Druckexemplar Publikation 2: Auszug Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“MEDICINE, RESEARCH and EXPERIMENTAL”**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 136 Journale

| Rank | Full Journal Title | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|--|-------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | NATURE MEDICINE | 79,243 | 30.641 | 0.162840 |
| 2 | Science Translational Medicine | 30,485 | 17.161 | 0.121980 |
| 3 | JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION | 108,879 | 12.282 | 0.139970 |
| 4 | TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE | 9,946 | 11.028 | 0.018900 |
| 5 | JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE | 63,983 | 10.892 | 0.071790 |
| 6 | EMBO Molecular Medicine | 7,507 | 10.624 | 0.025980 |
| 7 | Annual Review of Medicine | 6,068 | 10.091 | 0.009030 |
| 8 | MOLECULAR THERAPY | 16,991 | 8.402 | 0.030050 |
| 9 | MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE | 5,568 | 8.313 | 0.009020 |
| 10 | Theranostics | 8,769 | 8.063 | 0.020270 |
| 11 | EBioMedicine | 5,401 | 6.680 | 0.022310 |
| 12 | ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation | 1,361 | 6.183 | 0.001920 |
| 13 | Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology | 2,345 | 6.140 | 0.004130 |
| 14 | JCI Insight | 4,351 | 6.014 | 0.020440 |
| 15 | Molecular Therapy-Nucleic Acids | 3,189 | 5.919 | 0.010410 |
| 16 | Molecular Therapy-Oncolytics | 486 | 5.710 | 0.001990 |
| 17 | Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine | 10,131 | 5.570 | 0.014480 |
| 18 | Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine | 6,223 | 5.564 | 0.016730 |
| 19 | CLINICAL SCIENCE | 10,951 | 5.237 | 0.014190 |
| 20 | JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE | 4,083 | 5.203 | 0.006300 |

| Rank | Full Journal Title | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|--|-------------|-----------------------|-------------------|
| 21 | npj Vaccines | 282 | 5.020 | 0.001120 |
| 22 | AMYLOID-JOURNAL OF PROTEIN FOLDING DISORDERS | 1,335 | 4.919 | 0.003270 |
| 23 | Translational Research | 3,669 | 4.915 | 0.008530 |
| 24 | Molecular Therapy-Methods & Clinical Development | 1,078 | 4.875 | 0.004020 |
| 25 | Vaccines | 1,077 | 4.760 | 0.003910 |
| 26 | JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE-JMM | 7,195 | 4.746 | 0.010880 |
| 27 | EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE | 4,046 | 4.743 | 0.007380 |
| 28 | Stem Cell Reviews and Reports | 2,436 | 4.697 | 0.004690 |
| 29 | CANCER GENE THERAPY | 2,842 | 4.681 | 0.003200 |
| 30 | EPMA Journal | 815 | 4.661 | 0.001320 |
| 31 | JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE | 12,391 | 4.658 | 0.015760 |
| 32 | Stem Cell Research & Therapy | 6,132 | 4.627 | 0.015810 |
| 33 | Cancer Biology & Medicine | 1,043 | 4.467 | 0.003040 |
| 34 | EXPERT REVIEWS IN MOLECULAR MEDICINE | 1,758 | 4.407 | 0.001450 |
| 35 | mAbs | 4,415 | 4.405 | 0.011150 |
| 36 | MOLECULAR PHARMACEUTICS | 16,792 | 4.396 | 0.028020 |
| 37 | CYTOTHERAPY | 5,969 | 4.297 | 0.009690 |
| 38 | JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE | 5,868 | 4.287 | 0.008410 |
| 39 | PPAR Research | 1,434 | 4.186 | 0.001600 |
| 40 | ARCHIVES OF PATHOLOGY & LABORATORY MEDICINE | 10,039 | 4.151 | 0.012620 |
| 41 | Journal of Translational Medicine | 10,831 | 4.098 | 0.022910 |
| 42 | CTS-Clinical and Translational Science | 1,351 | 3.989 | 0.003190 |

| Rank | Full Journal Title | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|--|-------------|-----------------------|-------------------|
| 43 | HUMAN GENE THERAPY | 5,639 | 3.855 | 0.007540 |
| 44 | Nucleic Acid Therapeutics | 854 | 3.780 | 0.003000 |
| 45 | GENE THERAPY | 7,223 | 3.749 | 0.007040 |
| 46 | BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY | 14,983 | 3.743 | 0.023480 |
| 47 | Annals of Translational Medicine | 3,430 | 3.689 | 0.010900 |
| 48 | Orphanet Journal of Rare Diseases | 6,654 | 3.687 | 0.015860 |
| 49 | LABORATORY INVESTIGATION | 10,025 | 3.684 | 0.009110 |
| 50 | MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM | 7,018 | 3.610 | 0.009900 |
| 51 | EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY | 4,481 | 3.585 | 0.007720 |
| 52 | Wiley Interdisciplinary Reviews-Systems Biology and Medicine | 1,165 | 3.542 | 0.002190 |
| 53 | XENOTRANSPLANTATION | 1,689 | 3.484 | 0.002390 |
| 54 | CELL TRANSPLANTATION | 5,941 | 3.477 | 0.009210 |
| 55 | JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY | 3,142 | 3.455 | 0.004000 |
| 56 | LIFE SCIENCES | 21,687 | 3.448 | 0.016400 |
| 57 | VACCINE | 40,222 | 3.269 | 0.070760 |
| 58 | American Journal of Translational Research | 5,434 | 3.266 | 0.012240 |
| 59 | ADVANCES IN THERAPY | 3,008 | 3.260 | 0.006540 |
| 60 | STEM CELLS AND DEVELOPMENT | 7,899 | 3.147 | 0.013510 |
| 61 | Drug Delivery and Translational Research | 1,298 | 3.111 | 0.002430 |
| 62 | Journal of Diabetes Research | 3,653 | 3.040 | 0.011530 |
| 63 | EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE | 6,301 | 3.005 | 0.007610 |
| 64 | MOLECULAR MEDICINE | 4,918 | 2.991 | 0.004770 |

Publikation 2

Andreas Eisenreich, Miriam Orphal, Karen Böhme, Reinhold Kreutz

Tmem63c is a potential pro-survival factor in angiotensin II-treated human podocytes

Life Sciences, 2020; 258:118175.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118175>

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Wissenschaftliche Fachartikel

- Subrova J, Böhme K, Gillespie A, **Orphal M**, Plum C, Eisenreich A, Kreutz R: MiRNA-29b and miRNA-497 modulate the expression of carboxypeptidase X member 2, a candidate gene associated with left ventricular hypertrophy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022; 23:2263.
- **Orphal M**, Gillespie A, Böhme K, Subrova J, Eisenreich A, Kreutz R: TMEM63C, a potential novel target for albuminuria development, is regulated by microRNA-564 and transforming growth factor beta in human renal cells. *Kidney and Blood Pressure Research*, 2020; 45:850-62.
- Eisenreich A, **Orphal M**, Böhme K, Kreutz R: Tmem63c is a potential pro-survival factor in angiotensin II-treated human podocytes. *Life Sciences*, 2020; 258:118175.
- Leppert U, Gillespie A, **Orphal M**, Böhme K, Plum C, Nagorsen K, Berkholz J, Kreutz R, Eisenreich A: The impact of α -Lipoic acid on cell viability and expression of nephrin and ZNF580 in normal human podocytes. *European Journal of Pharmacology*, 2017; 810:1-8.

Wissenschaftliche Konferenzbeiträge

- **Orphal M**, Gillespie A, Schulz A, Kreutz R, Eisenreich A: MiRNA-mediated post-transcriptional control of Tmem63c expression in human podocytes. Poster, 40. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®], Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, 01.-03.12.2016, Berlin (GER)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, welche mich auf dem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhold Kreutz für die ausgesprochen gute Betreuung. Ich bin sehr dankbar für die guten Gespräche und die hilfreichen Anregungen auf dem gesamten Weg.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Andreas Eisenreich, welcher mich mit großem Engagement bis zur Promotion begleitet hat und mich mit seinen kreativen Ideen und seiner langjährigen Laborerfahrung uneingeschränkt unterstützte.

Einen weiteren Dank möchte ich an Karen Böhme aussprechen. Ihre Leidenschaft und Gewissenhaftigkeit im experimentellen Arbeiten waren für mich stets ein großes Vorbild. Auch möchte ich Claudia Plum und Petra Karsten danken für ihre Unterstützung im experimentellen Arbeiten.

Ich bin sehr dankbar, dass ich die Möglichkeit hatte in dem Institut der klinischen Pharmakologie und Toxikologie promovieren zu können und werde die angenehme Atmosphäre sowie die produktiven Diskussionen in guter Erinnerung behalten.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, welche mich auf meinem Weg zur Promotion zu jedem Zeitpunkt unterstützten und mir mit ihrer ehrlichen Meinung und ihrem guten Rat zur Seite standen. Ein besonderer Dank gilt hierbei meinem Partner und meinem Sohn, sowie meinen Eltern und meiner Schwester. Ich bin Euch sehr dankbar für Eure Unterstützung, den emotionalen Rückhalt und die Liebe, die Ihr mich jeden Tag aufs Neue fühlen lasst.