

Die Bedeutung des Sphingolipidstoffwechsels für die Generierung von inflammatorischen und fibrotischen Mediatoren in renalen Mesangiumzellen

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium genehmigte

Dissertation

von Diplom-Biologin

Anja Völzke

aus Zittau

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Heribert Warzecha

Tag der Einreichung: 25. April 2013

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2013

Darmstadt 2013

D17

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Sphingolipide	1
1.1.1 Struktur der Sphingolipide	1
1.1.2 Sphingolipidstoffwechsel.....	3
1.1.3 Struktur der Sphingosinkinasen (SKs).....	5
1.1.4 Wirkung von S1P und dessen Rezeptoren.....	8
1.1.5 Die Rolle von Sphingolipiden bei Nierenerkrankungen	11
1.2 <i>Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)</i>	16
1.2.1 Aufbau, Struktur und Wirkung von PPAR γ als Transkriptionsfaktor.....	18
1.2.2 Thiazolidindione (TZDs)	20
1.3 Eicosanoide	21
1.3.1 Biosynthese und Funktion von Prostaglandinen.....	23
1.3.2 Cyclooxygenasen (COX)	26
1.4 Zielsetzung der Arbeit	31
2 MATERIAL UND METHODEN	34
2.1 Materialien	34
2.1.1 Chemikalien	34
2.1.2 Zellkulturreagenzien	35
2.1.3 Zelllinien.....	35
2.1.4 Medien	36
2.1.5 Antikörper	37
2.1.6 Enzyme	38
2.1.7 Plasmidvektoren	38

2.1.8	Bakterienstämme	38
2.1.9	siRNA-Oligonukleotide	39
2.1.10	Taqman [®] -Sonden	39
2.1.11	Puffer und Lösungen.....	39
2.1.12	Kits / Assays / Transfektionsreagenzien	44
2.1.13	Verbrauchsmaterialien	45
2.1.14	Geräte	45
2.2	Versuchstiere	46
2.2.1	Verwendete Tiere	46
2.2.2	Haltung und Zucht der Mäuse	46
2.2.3	Tierversuch	47
2.3	Zellkultur	47
2.3.1	Kultivierung von Zellen.....	47
2.3.2	Subkultivierung von Zellen.....	47
2.3.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	47
2.3.4	Stimulation von Zellen	48
2.3.5	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	48
2.3.6	Elektroporation von eukaryotischen Zellen mit der Amaxa TM -Methode.....	48
2.4	Bakterienkultur	49
2.4.1	Herstellung von kompetenten Bakterien	49
2.4.2	Transformation von Bakterien.....	50
2.5	Molekularbiologische Methoden	50
2.5.1	DNA-Techniken	50
2.5.2	Klonierung von DNA-Fragmenten	54
2.5.3	Bestimmung der Promotoraktivität.....	55
2.5.4	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i>	56
2.5.5	RNA-Techniken.....	59
2.6	Bestimmung zellulärer Parameter	62
2.6.1	Sphingosinkinase-Aktivitätsassay	62
2.6.2	Quantitative Ceramid-, Sphingosin- und Sphingosin-1-Phosphat-Bestimmung mittels Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	63
2.6.3	Präparation und Fixierung von Gewebeschnitten	63

2.6.4	PAS-Färbung von Gewebeschnitten	64
2.7	Proteinbiochemische Methoden	65
2.7.1	Herstellung von Proteinextrakten	65
2.7.2	Bestimmung des Proteingehaltes	66
2.7.3	Trichloressigsäure (TCA)-Präzipitation von Proteinen aus Zellüberständen	66
2.7.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
2.7.5	Elektrotransfer.....	67
2.7.6	Immunochemischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot-Analyse)	68
2.7.7	Messung von Prostaglandin E ₂ in Zellkulturüberständen mittels ELISA	68
2.7.8	Statistische Analyse.....	69
3	ERGEBNISSE	70
3.1	Wirkung von TZDs auf den Sphingolipidmetabolismus in Mesangiumzellen.....	70
3.1.1	Wirkung von TZDs auf die S1P-, Sphingosin und C16-Ceramid-Spiegel in Mesangiumzellen der Ratte	70
3.1.2	Wirkung von TZDs auf die SK-1-Aktivität in Mesangiumzellen der Ratte	72
3.1.3	Wirkung von TZDs auf die Protein- und mRNA-Expression der SK-1 in Mesangiumzellen der Ratte	73
3.1.4	Wirkung von TZDs auf die Protein- und mRNA-Expression der SK-1 in humanen Mesangiumzellen und Mausmesangiumzellen.....	75
3.1.5	Wirkung von TZDs auf die SK-1 <i>in vivo</i>	77
3.1.6	Einfluss von PPAR γ auf die SK-1-Expression in Mesangiumzellen der Ratte ..	78
3.1.7	Wirkung von TZDs auf die Promotoraktivität der SK-1 in Mesangiumzellen der Ratte	80
3.1.8	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	82
3.2	Wirkung von TZDs auf die CTGF-Expression	83
3.2.1	Wirkung von TZDs auf die CTGF-Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte, Maus und Mensch.....	84
3.2.2	Wirkung von TZDs, TGF- β und SKI II auf die CTGF-Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte	85
3.2.3	Wirkung von TZDs auf die CTGF-Proteinexpression in Mesangiumzellen der Maus	86

3.3	Wirkung von PPARγ-Agonisten auf den S1P₁-Rezeptor	89
3.4	Wirkung von extrazellulärem S1P auf die Expression der COX-2	93
3.4.1	Wirkung von S1P auf die Protein- und mRNA-Expression der COX-2 in Mesangiumzellen der Ratte	93
3.4.2	Wirkung von Actinomycin D auf die mRNA-Expression der COX-2 in Rattenmesangiumzellen	95
3.4.3	Wirkung der S1P-Rezeptorantagonisten JTE-013, W146 und VPC-23019 auf die Proteinexpression der COX-2	96
3.4.4	Wirkung von S1P ₂ -Rezeptor siRNA auf die Proteinexpression der COX-2	97
3.4.5	Wirkung PTX und Y 27632 auf die Proteinexpression der COX-2 in Mesangiumzellen der Ratte	99
3.4.6	Einfluss der MAPK-Inhibitoren PD 98059, U0126 und SB 203580 auf die Proteinexpression der COX-2 in Mesangiumzellen der Ratte	100
3.4.7	Wirkung von S1P auf die Ang II-induzierte PGE ₂ -Synthese in Mesangiumzellen der Ratte.....	102
3.4.8	Wirkung von S1P und IL-1 β auf die COX-2- Proteinexpression und PGE ₂ - Konzentrationen in Mesangiumzellen der Ratte.....	104
3.5	Wirkung von intrazellulärem S1P auf die COX-2- Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte und der Maus	107
4	DISKUSSION.....	110
4.1	Wirkung von TZDs auf den Sphingolipidmetabolismus in Mesangiumzellen.....	110
4.2	Wirkung von PPARγ-Agonisten auf den S1P₁-Rezeptor.....	119
4.3	Wirkung von extrazellulärem S1P auf die Expression der COX-2 und Biosynthese von PGE₂ in Mesangiumzellen.....	122
4.4	Wirkung von extrazellulärem S1P und IL-1β auf die COX-2- Expression und Biosynthese von PGE₂ in Mesangiumzellen.....	128
4.5	Wirkung von intrazellulärem S1P auf die Expression der COX-2 in Mesangiumzellen	129
4.6	Therapeutische Relevanz.....	131

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	134
6	LITERATUR.....	136
7	ANHANG	158
7.1	Verwendete Primer	158
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	159
7.3	Tabellenverzeichnis	161
7.4	Veröffentlichungen	161
7.4.1	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit	161
7.4.2	Sonstige Veröffentlichungen.....	161
7.4.3	Kongressbeiträge	162
LEBENS LAUF		165

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AC	Adenylatzyklase
Act D	Actinomycin D
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
AP-1	<i>activator protein 1</i>
AS	Aminosäure(n)
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
COX	Cyclooxygenase(n)
cPLA ₂	cytosolische Phospholipase A ₂
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
C1P	Ceramid-1-Phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DN	diabetische Nephropathie
(d)dH ₂ O	(doppelt) destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMS	Dimethylsphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosidtriphosphat
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
Edg	<i>endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
eS1P	extrazelluläres S1P
FCS	fötales Kälberserum

GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
hMc	humane Mesangiumzellen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hSK-1	humane Sphingosinkinase-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
iPLA ₂	kalziumunabhängige Phospholipase A ₂
INF- γ	Interferon- γ
iS1P	intrazelluläres S1P
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MLK3	<i>mixed-lineage kinase 3</i>
mMc	Mausmesangiumzellen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid-Chromatographie/</i> Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
mSK-1	Sphingosinkinase-1 der Maus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NES	<i>nuclear export signal</i>
NF-kB	nukleärer Faktor-kB
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Phosphatidylinosit
PIO	Pioglitazon
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D

PLC	Phospholipase C
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PPRE	<i>peroxisome proliferator response element</i>
rMc	Rattenmesangiumzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RSG	Rosiglitazon
rSK-1	Sphingosinkinase-1 der Ratte
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SK-1/-2	Sphingosinkinase-1/-2
SKI II	Sphingosinkinaseinhibitor 2-(p-Hydroxyanilino)-4-(p-Chlorophenyl)-thiazol
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A ₂
STZ	Streptozotozin
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PP	Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatase
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
TAK1	<i>transforming growth factor-β-aktivierte-Kinase</i>
TRAF 2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
TM	Transmembranregion
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRO	Troglitazon
TZDs	Thiazolidindione
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Sphingolipide

Sphingolipide sind wichtige Bestandteile der Zellmembran und bilden neben Glycerophospholipiden und Sterolen eine der drei Hauptgruppen eukaryotischer Membranlipide [1]. Im Vergleich zu anderen Lipidklassen zeigen Sphingolipide neben ihrer chemischen Struktur auch Unterschiede in ihren physiologischen Eigenschaften. 1884 wurden sie erstmals durch den Deutschen Mediziner J. L. W. Tudichum beschrieben, der diese Lipidklasse durch fraktionelle Kristallisation von ethanolischen Gehirnextrakten isolierte. Aufgrund ihrer rätselhaften Funktion und besonderen Eigenschaften nannte J. L. W. Tudichum diese Lipide in Anlehnung an die aus der griechischen Mythologie stammenden Sphinx „Sphingolipide“ [1-2]. Heute sind über 400 Sphingolipide bekannt [3-4], die in eukaryotischen Zellen hauptsächlich in der Plasmamembran, aber auch in den Membranen des Golgi-Apparates und in den Lysosomen zu finden sind [5-6]. Waren Sphingolipide in den letzten Jahrzehnten vor allem als strukturgebende Bestandteile von Zellmembranen bekannt, zeigen jüngste Studien, dass sie zunehmend auch als bioaktive Signalmoleküle fungieren und an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt sind. So sind Sphingolipide beispielsweise an der Regulierung der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt und sind auf diese Weise für die Zellhomöostase und die normale Zellentwicklung unerlässlich [4, 6]. Genetische Störungen im Sphingolipidmetabolismus führen zu zellulären Sphingolipidanreicherungen, vor allem in den Lysosomen, und sind die Ursache von Sphingolipidosen wie der Gauchers-, Niemann-Pick-, Tay-Sachs-, Sandhoffs-, Fabrys- und Krabbes Krankheit [7].

1.1.1 Struktur der Sphingolipide

Sphingolipide gehören zur Klasse der polaren Membranlipide und setzen sich in Säugetierzellen chemisch aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin als Rückgrat, einer polaren Kopfgruppe und einer Fettsäure, die über eine Amid-Bindung mit dem C2-Atom des Sphingosins verbunden ist, zusammen. Bei Glycerophospholipiden bildet ein Glycerolrest das Rückgrat. Anders als in Zellen von Säugetieren ist bei Pflanzen und Pilzen anstelle des Sphingosins das strukturell ähnliche Phytosphingosin Bestandteil des entsprechenden Sphingolipids. Die Fettsäuren der Sphingolipide von Säugetierzellen haben

meistens eine Kettenlänge von 18 C-Atomen und sind einfach ungesättigt [3]. Diese Struktureinheit ist als Ceramid bekannt und dient als Ausgangspunkt für die Biosynthese aller Sphingolipide. Je nach Substituent, der an der polaren Kopfgruppe am C1-Atom gebunden ist, werden drei verschiedene Untergruppen der Sphingolipide klassifiziert. Zu diesen zählen die Ceramide und die daraus abgeleiteten Sphingomyeline und Glykosphingolipide. Durch den Austausch der primären Hydroxylgruppe am Ceramid-Rest durch unterschiedliche funktionelle Gruppen kann eine Vielzahl von komplexen Sphingolipiden entstehen. Dies begründet die große strukturelle Vielfalt von mehr als 400 bekannten Sphingolipiden. Durch zusätzliche Variationen am Rückgrat und an den Fettsäuren umfasst das Sphingolipidom mehrere tausend Sphingolipide [8-9, www.sphingomap.org]. Fungiert Phosphat als Substituent am C1-Atom des Ceramids, wird Ceramid-1-Phosphat (C1P) gebildet. Durch die Veresterung von Ceramid mit Phosphatidylcholin an der primären Hydroxylgruppe entsteht das in der Zelle am häufigsten vorkommende Sphingolipid Sphingomyelin. Es gehört zur Gruppe der Sphingophospholipide. Besteht der Substituent dagegen nur aus neutralen Zuckern, so liegt ein neutrales Glykosphingolipid vor. Zu dieser Gruppe zählen die niedrigglykosylierten Cerebroside (z.B. Glukosylceramid und Galaktosylceramid), die Sulfatide und die Ganglioside. Die Sulfatide haben neben einem Glukosylrest zusätzlich noch einen Sulfatrest. Die Ganglioside dagegen besitzen komplexer aufgebaute Oligosaccharide als Substituenten, deren wesentlicher Bestandteil die Sialinsäure ist. Sie bilden auch zugleich die komplexeste und vielfältigste Gruppe der Sphingolipide. Darüber hinaus findet man in Zellen auch Lysosphingolipide wie beispielsweise Galactosylsphingosin, Glucosylsphingosin, Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Sphingosin und Lysosphingomyelin. Sie stellen N-deacetylierte Derivate dar, die im Gegensatz zu den bereits genannten Sphingolipiden Sphingosin anstatt Ceramid als zentrale Kernstruktur besitzen. Aus der Anlagerung einer Phosphatgruppe entsteht so zum Beispiel S1P. Im Ruhezustand einer Zelle liegen Lysosphingolipide in niedrigen Konzentrationen vor. Dennoch können sie wie beispielsweise S1P wichtige Signalfunktionen ausüben und durch ihre lytischen und membrandestabilisierenden Effekte die Zellfunktion beeinflussen [5-6].

1.1.2 Sphingolipidstoffwechsel

Die Synthese der einzelnen Sphingolipidmetabolite kann zum einen über den katabolen Stoffwechselweg, zum anderen durch die *de-novo-Synthese* erfolgen. Die *de-novo-Synthese* von Sphingolipiden, in der in 4 Schritten Ceramid synthetisiert wird, findet an der zytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt und beginnt mit der Synthese des Vorläufermoleküls Ceramid. In diesem ersten Schritt katalysiert die Serin-Palmitoyl-Transferase die Kondensation der AS Serin mit Palmitoyl-CoA. Dabei entsteht Dehydrosphingamin, das wiederum durch die NADPH-abhängige Reduktase zu Sphingamin (Dihydrosphingosin) reduziert wird. In der anschließenden Addition eines langkettigen Acyl-CoA-Restes durch die Ceramidsynthase entsteht zunächst Dihydroceramid, das dann direkt durch die Einführung einer Doppelbindung zwischen C4 und C5 des Lipidrückgrates in Ceramid umgewandelt wird. Dieser Schritt wird durch die Aktivität einer Desaturase katalysiert [10]. Eine direkte Umwandlung von Dihydrosphingosin zu Sphingosin findet nicht statt. Das synthetisierte Ceramid kann dann mit Hilfe von sekretorischen Vesikeln vom ER zum Golgiapparat transportiert und in weitere komplexe Sphingolipide umgewandelt werden [11-13].

Der katabole Stoffwechselweg der Sphingolipide beschreibt die Hauptsynthesequelle für Ceramid. Hier wird Ceramid durch die Aktivität von Sphingomyelinasen aus dem plasmamembranintegrierten Sphingomyelin hydrolysiert. Proinflammatorische Zytokine wie beispielweise Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Interferon- γ (INF- γ), Chemotherapeutika, UV-Licht, Bestrahlung oder NO aktivieren die Sphingomyelinasen [6, 14-17]. Das gebildete Ceramid kann anschließend in einer gegenläufigen Reaktion durch die Sphingomyelinsynthase wieder zu Sphingomyelin resynthetisiert werden, oder es kann durch die Ceramidkinase zu C1P phosphoryliert werden. Desweiteren können verschiedene Ceramidasen das gebildete Ceramid reversibel zu Sphingosin deacylieren, welches als Substrat für die Sphingosinkinasen (SK) dient. Nach dem Transport von Sphingosin durch Endosomen in das Zytosol wird Sphingosin durch die SK zu S1P phosphoryliert. Das gebildete S1P kann in einer Gegenreaktion im ER durch S1P-Phosphatasen (S1PP) wieder zu Sphingosin dephosphoryliert werden, welches dann wiederum für die Ceramidsynthese zur Verfügung steht. In einem letzten Schritt kann S1P zwischen dem C2- und dem C3-Atom durch die ER-ständige S1P-Lyase irreversibel in die Endprodukte Phosphoethanolamin und Hexadecenal abgebaut werden. Die Aktivität der beiden letzteren S1P-abbauenden Enzyme ist für die im Normalzustand

vorliegenden niedrigen intrazellulären S1P (iS1P)-Konzentrationen in den meisten Zelltypen verantwortlich [11-12, 18].

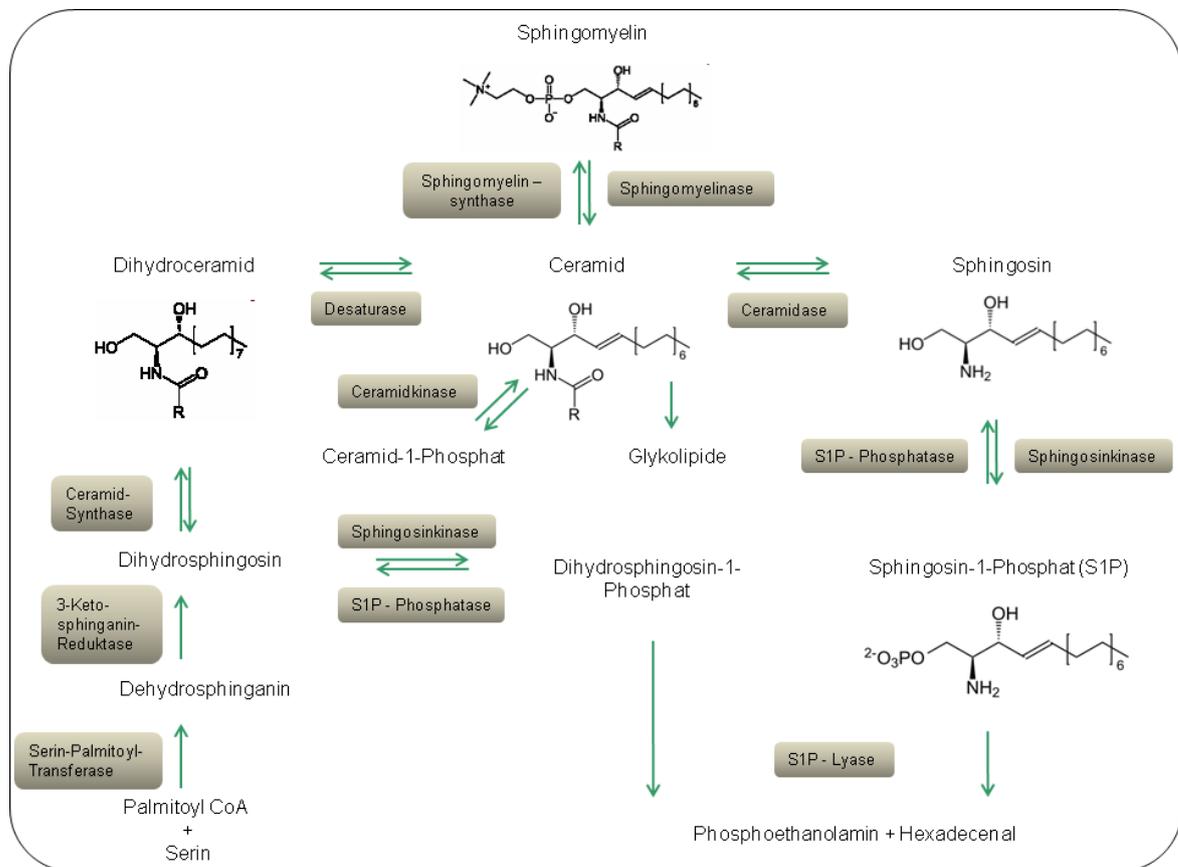


Abb. 1: Schematische Darstellung der Biosynthese von Sphingolipiden.

Dargestellt sind die Sphingolipid-*de-novo*-Synthese und der katabole Stoffwechselweg. Die für die jeweilige Umwandlung der Sphingolipide verantwortlichen Enzyme sind braun hinterlegt.

Das zelluläre Gleichgewicht zwischen den Sphingolipid-Signalstoffen Ceramid und S1P spielt eine entscheidende Rolle bei funktionellen Zellantworten wie der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und dem Zelltod. Dabei agiert Ceramid als proapoptotisches und wachstumshemmendes Lipid, während S1P zellprotektive und wachstumfördernde Funktionen in der Zelle ausübt und dadurch als „Gegenspieler“ von Ceramid wirkt. Durch die zwei Enzymklassen der Ceramidasen und SKs wird in der Zelle ein sogenanntes „Sphingolipid-Gleichgewicht“ durch die stete Interkonvertierbarkeit der Lipide aufrechterhalten. Das zu einem bestimmten Zeitpunkt in seiner Konzentration dominierende Sphingolipid entscheidet so über das Schicksal der Zelle, und zwar ob es zum Zelltod oder zum Wachstum kommt. Dabei sind jedoch nicht die absoluten

Konzentrationen der einzelnen Sphingolipide entscheidend, vielmehr ist das Verhältnis der gegensätzlich wirkenden Metaboliten ausschlaggebend [19-20]. Um weitere Erkenntnisse über den Wirkmechanismus der SKs zu erhalten, wurde in dieser Arbeit diese Enzymgruppe näher untersucht.

1.1.3 Struktur der Sphingosinkinasen (SKs)

SKs sind in Säugetierzellen ubiquitär vorkommende Enzyme, die zur Klasse der Lipidkinasen gehören. Sie katalysieren mit Hilfe von Adenosintriphosphat (ATP) die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P [20-22]. 1973 wurden diese Enzyme erstmalig bei Versuchen mit Thrombozyten durch Stoffel *et al.* beschrieben [23-24]. Bis heute sind zwei SKs charakterisiert: SK-1 und SK-2. Die SK-1 wurde 1998 als 49 kDa großes Enzym von Olivera *et al.* aus der Rattenniere isoliert und gereinigt [25]. Im selben Jahr wurde auch die murine Form der SK-1 (Variante a und b) kloniert und funktionell charakterisiert [26]. Das humane Homologe wurde 2000 von Melendez *et al.* kloniert, funktionell charakterisiert und auf seine Gewebeexpression hin untersucht [27]. Von der humanen Kinase (hSK) existieren drei alternative Splicevarianten hSK-1a, hSK-1b und hSK-1c mit einer Länge von 384, 399 und 470 Aminosäuren (AS) [28]. Anhand von BLAST-Datenbank-Analysen mit der murinen SK-1 wurde die zweite Isoform, die SK-2 von Liu *et al.* (2000) kloniert und funktionell charakterisiert. Die SK-2 weist eine hohe Homologie zur SK-1 auf, besitzt aber 240 zusätzliche am N-Terminus und im Zentrum des Proteins lokalisierte AS [29]. Außerdem weisen sie Abweichungen in ihrer Stabilität und Lokalisation auf [30]. Homologe der SKs wurden auch in anderen Organismen wie beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana* identifiziert [22, 31]. Obwohl beide SK-Isoformen eine große Homologie aufweisen, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer chromosomalen Lokalisation, Struktur, kinetischen und biochemischen Eigenschaften, Gewebsverteilung, Expression im Verlaufe der embryonalen Entwicklung und ihrer subzellulären Lokalisation sowie ihrer Substratspezifität [32].

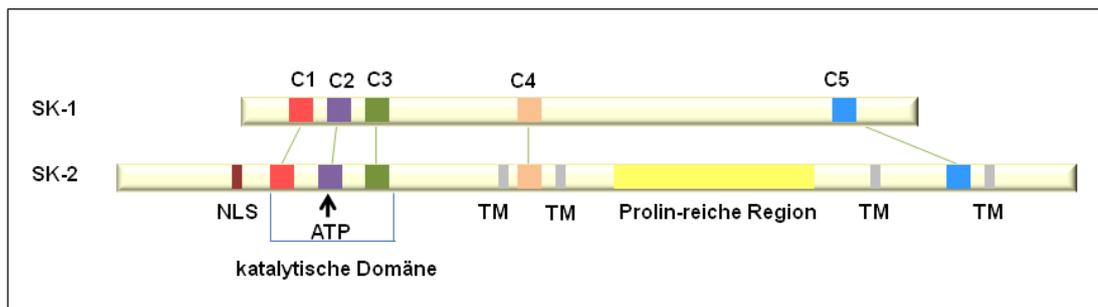


Abb. 2: Struktur der Sphingosinkinase-1 und -2 (SK-1 und -2).

Vereinfachte Darstellung der Proteinstruktur der SK-1 und SK-2. Veranschaulicht sind die fünf konservierten Domänen (C1-C5), die Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle in der katalytischen Domäne als auch die Transmembranregionen (TM), die Prolin-reiche Region und die *nuclear localisation signal* (NLS)-Region in der SK-2.

Beide SKs sind vom Bakterium bis zum Menschen ubiquitär vorkommende Enzyme aus der Familie der Diacylglycerolkinasen mit fünf hochkonservierten Domänen (C1-C5) und einer einheitlichen katalytischen Domäne in C1-C3. Die ATP-Bindungsdomäne (SGDGX(17-21)K(R)) ist innerhalb der C2-Domäne und die für Sphingosin ist in der für SKs spezifischen C4-Domäne lokalisiert. Eine Mutation von Glycin zu Aspartat in dieser Domäne resultiert in einer inaktiven SK-Mutante [33]. Die Domänen C1-C3 zeigen eine große Ähnlichkeit zu der ATP-Bindungsstelle der katalytischen, Glycin-reichen Domäne der Diacylglycerolkinase und der Ceramidkinase. Die SK-2 unterscheidet sich von dem Isoenzym des Typs 1 in einer längeren N-terminalen Sequenz mit einer funktionellen *nuclear localisation signal* (NLS)-Region, die das Enzym in das Nukleoplasma einschleust und somit für die nukleäre Lokalisation verantwortlich ist sowie einer zentralen Prolin-reichen Region zwischen C4 und C5. Außerdem besitzt die SK-2 vier Transmembranregionen (TM) mit denen die SK-2 mit Membranproteinen interagieren kann. Die AS-Sequenz der SK-1 weist keine hydrophoben TM auf [34]. Zahlreiche Studien postulieren, dass sich die beiden SK-Isoformen redundant zueinander verhalten, da sowohl SK-1- als auch SK-2-*knockout*-Mäuse einen normalen Phänotyp besitzen. Im Gegensatz dazu führt die Elimination beider Gene während der Embryonalentwicklung von Mäusen zu Defekten in der Angiogenese sowie Neurogenese und ist embryonal letal [35-36]. Trotz allem werden beide Isoformen während der Entwicklung des Organismus unterschiedlich exprimiert. Im Verlauf der embryonalen Entwicklung erreichen die mRNA-Spiegel der SK-1 am Tag 7 ihr Maximum und die der SK-2 steigen bis zum 17. Tag an [29-30]. Zusätzlich unterscheiden sie sich in ihrer subzellulären Lokalisation und der Gewebeverteilung. Während die SK-1 in adulten Geweben vorwiegend im Zytosol

lokalisiert ist und am stärksten im Gehirn, Herz, Lunge, Thymus, Milz und den Nieren exprimiert wird, ist die SK-2 vornehmlich im Nukleus und am ER lokalisiert und wird hauptsächlich in den Nieren und der Leber gefunden. 2007 wurde von Ding *et al.* gezeigt, dass die SK-2 nach Phosphorylierung durch die Proteinkinase D (PKD) aus dem Nukleus ins Zytoplasma exportiert werden kann [37], wo es weitere Signalkaskaden in Gang setzen kann. Zusätzlich unterscheiden sich beide Isoformen in ihrer Funktion. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der SK-1 zu einer vermehrten Proliferation und Migration führt und Apoptose inhibiert, wohingegen der SK-2 aufgrund ihrer zusätzlichen BH3-Domäne eine proapoptotische Rolle zugeschrieben wird [21, 38]. 2008 konnte Hofmann *et al.* außerdem zeigen, dass SK-2-depletierte Mesangiumzellen der Maus resistenter gegen Apoptosestimuli sind [39]. Weiterhin unterscheiden sich die SK-1 und die SK-2 in ihren biochemischen Eigenschaften und Regulationsprozessen. Das bevorzugte Substrat der SK-1 ist D-erythro-Sphingosin und D-erythro-Dihydrosphingosin. Durch D/L-threo-Dihydrosphingosin und N,N-Dimethylsphingosin kann die SK-1 kompetitiv inhibiert werden [40-41]. Die SK-2 wiederum katalysiert die Phosphorylierung von Phytosphingosin, D/L-threo-Dihydrosphingosin und FTY720 [29-30, 42].

Die Aktivität der SK-1 wird durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli induziert, die meist einen schnellen, transienten Anstieg der SK-Aktivität induzieren, welche bereits nach einigen Minuten ein Maximum erreicht und danach schnell wieder absinkt. Andere Stimuli bewirken eine biphasische Aktivitätssteigerung mit einem schnellen Erstanstieg, gefolgt von einem verzögerten Anstieg aufgrund einer transkriptionell induzierten Regulation des Enzyms. Zu den Aktivatoren der SK-1 zählen G-Protein-gekoppelte-Rezeptor (GPCR)-Agonisten (Nukleotide, Lysophosphatidsäure, S1P und Bradykinin), Tyrosinkinase-rezeptor-Agonisten (*platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *nerve growth factor* (NGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF)), Zytokinrezeptoren für TNF- α , *transforming growth factor- β* (TGF- β) oder INF- γ , Interleukine, Ca²⁺-mobilisierende Substanzen und Phorbolster [20, 22, 43-44]. Die genauen molekularen Mechanismen der SK-Aktivierung sind allerdings noch nicht vollständig geklärt. In diesem Zusammenhang konnten Pitson *et al.* nachweisen, dass die Aktivierung der SK-1 durch eine Proteinkinase C (PKC)-abhängige Phosphorylierung erfolgt und eine Translokation des Enzyms an die Plasmamembran bewirkt [33, 45]. Durch die Plasmamembranlokalisation der SK-1 kommt es zu einer vermehrten S1P-Sekretion, das wiederum zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden führt. 2003 postulierte Pitson

et al., dass die Phosphorylierung der SK-1 über einen *extracellular signal regulated kinase* (ERK)1/2 vermittelten Weg verläuft. Des Weiteren ist bekannt, dass die *TNF receptor-associated factor* (TRAF2)-vermittelte Aktivierung der SK-1 für die TNF- α induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B) notwendig ist [46]. Durch die Hochregulation der SK-1 in Tumoren konnte diesem Enzym auch ein onkogenes Potenzial zugeschrieben werden. Zudem wurden in vielen humanen Tumoren erhöhte mRNA-Spiegel der SK-1 gemessen [47].

1.1.4 Wirkung von S1P und dessen Rezeptoren

S1P ist ein ubiquitär vorkommendes, bioaktives Lysophospholipid, das im menschlichen Organismus sowohl extrazellulär als auch intrazellulär wirken kann. Es reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse wie Wachstum, Überleben, Migration und Zell-Zell-Kommunikation. [6, 12, 48-56]. Auch in der Tumorbildung konnte für S1P eine wichtige Rolle nachgewiesen werden, indem es die Metastasierung und Proliferation von Krebszellen beeinflusst [57]. Wie bereits erwähnt, kann S1P im Sphingolipidmetabolismus entweder über eine *de-novo*-Synthese aus Serin und Palmitoyl-CoA im ER [58] oder durch Hydrolyse des Membranlipids Sphingomyelin mit Hilfe von Sphingomyelinasen entstehen [12, 58]. Die SKs phosphorylieren ferner das gebildete Sphingosin zu S1P. Im Serum kommt S1P vorwiegend in an Albumin gebundener Form vor und liegt im Bereich von 0,5 μ M [59]. Die Konzentration im Blutplasma liegt im nanomolaren Bereich bei etwa 200 nM und wird vor allem durch Erythrozyten gebildet [60]. Extrazellulär wirkt S1P als Ligand für fünf GPCRs, S1P₁₋₅ und führt zur Stimulation zahlreicher Signalwege wie dem Phospholipase C/Inositoltriphosphat/ Ca^{2+} -Signalweg, der Mitogen-aktivierten-Proeinkinase (MAPK)-Kaskade (auch ERK1/2 genannt) und dem Phosphoinositid-3-Kinase/Akt/NO-Synthase Weg sowie der Hemmung der Adenylatcyclase (AC) [61]. Intrazellulär wird S1P in erster Linie mit Hilfe der SKs durch die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P gebildet [62] und wirkt dort als klassischer *second messenger*. 1994 konnte Ghosh *et al.* [63] zeigen, dass iS1P Ca^{2+} aus Thapsigarin-sensitiven Speichern mobilisiert. Weiterhin ist bekannt, dass S1P im Zellkern Histondeacetylasen (HDACs) hemmt. In einigen Zelltypen interagiert die SK-2 im Zellkern direkt mit dem Histon-3 (H3) und es kommt zu einer vermehrten Acetylierung von H3 an Lysin⁹. In Zellen mit einer Überexpression der SK-2 kommt es zudem zu einer Acetylierung von H2B an Lysin¹² und von H4 an Lysin⁵. Das im

Zellkern durch die SK-2 synthetisierte S1P bindet direkt und spezifisch an die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 und inhibiert diese. Die Hemmung von HDACs durch die SK-2 hat zur Folge, dass es zu einer vermehrten Expression von Genen wie p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) und c-fos (*transcriptional regulator*) kommt [64]. Zudem konnte Strub *et al.* zeigen, dass an der inneren Mitochondrienmembran gebildetes S1P durch die SK-2 mit dem mitochondrialen Protein Prohibitin 2 (PHB2) interagiert. Diese Interaktion spielt eine wichtige Rolle im Aufbau der Cytochrom-c-Oxidase [65]. Intrazelluläres S1P kann auch durch die Bindung als Kofaktor an die Ubiquitinligase TRAF2, welche die NF- κ B-Aktivierung durch TNF- α vermittelt, wirken. Der genaue Mechanismus konnte durch Alvarez *et al.* [46] aufgeklärt werden. Das durch die SK-1 gebildete S1P ist Voraussetzung für die TRAF2-vermittelte Polyubiquitylierung an Lysin⁶³ von RIP1 (*receptor-interacting protein 1*), welches seinerseits für die Aktivierung der I κ B-Kinase verantwortlich ist. In Folge dessen wird NF- κ B durch den Abbau von I κ B aktiviert.

Neben den beschriebenen verschiedenen Wirkmechanismen von S1P zeigen extrazelluläres und intrazelluläres S1P auch gegensätzliche Effekte auf zahlreiche Zellantworten wie beispielsweise der Fibrose. In diesem Zusammenhang konnte Li *et al.* (2008) [66] durch eS1P eine verstärkte Expression des pro-fibrotischen Bindegewebswachstumsfaktors *connective tissue growth factor* (CTGF) zeigen. Auch konnte Ren *et al.* (2009) [67] zeigen, dass eS1P pro-fibrotisch wirkt. Aus den publizierten Daten geht hervor, dass TGF- β nicht nur die Expression von CTGF, sondern auch der SK-1 induziert. Zudem wurde die CTGF-Expression durch die Verwendung des SK-1 Inhibitors Sphingosinkinaseinhibitor 2-(p-Hydroxyanilino)-4-(p-Chlorophenyl)-thiazol (SKI II) oder siRNA gegen SK-1 verstärkt. Auf der anderen Seite wiederum haben Ren *et al.* (2009) [67] gezeigt, dass iS1P auch anti-fibrotisch wirken kann, indem es durch die TGF- β vermittelte Aktivierung der SK-1 oder deren Überexpression in humanen Podozyten zu einer vermehrten iS1P-Produktion kam und daraufhin die CTGF-Expression herunter reguliert wurde. Daher ist es wichtig die molekularen Mechanismen von S1P auf die verschiedenen Rezeptoren und Zellkompartimente und die daran gekoppelten Signalwege in verschiedenen Zellsystemen zu verstehen um für zahlreiche Erkrankungen wie der Fibrose weitere Therapieansätze zu finden.

Der erste S1P-Rezeptor (S1PR) wurde in der Endothelzelllinie HUVEC nachgewiesen und aufgrund des zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntem Liganden als *endothelial*

differentiation gene 1 (Edg-1) bezeichnet. EDG-Rezeptoren werden inzwischen als S1PRs 1-5 (S1P₁₋₅) bezeichnet. Mit Ausnahme des S1P₄-Rezeptors, der hauptsächlich in lymphatischen Geweben und der Lunge vorkommt und des S1P₅-Rezeptors, der vornehmlich im Gehirn und in der Haut zu finden ist, werden alle S1PRs ubiquitär exprimiert [61]. In der Niere werden der S1P₁₋₃- und der S1P₅-Rezeptor exprimiert [68]. S1PRs entfalten ihre unterschiedliche Wirkung durch nachgeschaltete Signalkaskaden, die an heterotrimere G-Proteine wie G_{i/o}, G_q und G_{12/13} gekoppelt sind. Diese heterotrimeren G-Proteine dissoziieren bei Aktivierung in ihre Untereinheiten und leiten die Signale an verschiedene Wege weiter. Es ist bekannt, dass der S1P₁-Rezeptor ausschließlich an G_{i/o}-, der S1P₂- und der S1P₃-Rezeptor an G_{i/o}-, G_q- und G_{12/13}- und der S1P₄- sowie der S1P₅-Rezeptor an G_{i/o}- und G_{12/13}-Signalwege koppeln [69-70]. Zu den nachgeschalteten Signalwegen gehören unter anderem der Phospholipase C (PLC)-, der PKC-, der ERK-, sowie der Rho- und AC-Weg (Abb. 3). Letzterer kann durch Aktivierung der S1PRs, welche alle an G_{i/o} koppeln, inhibiert werden.

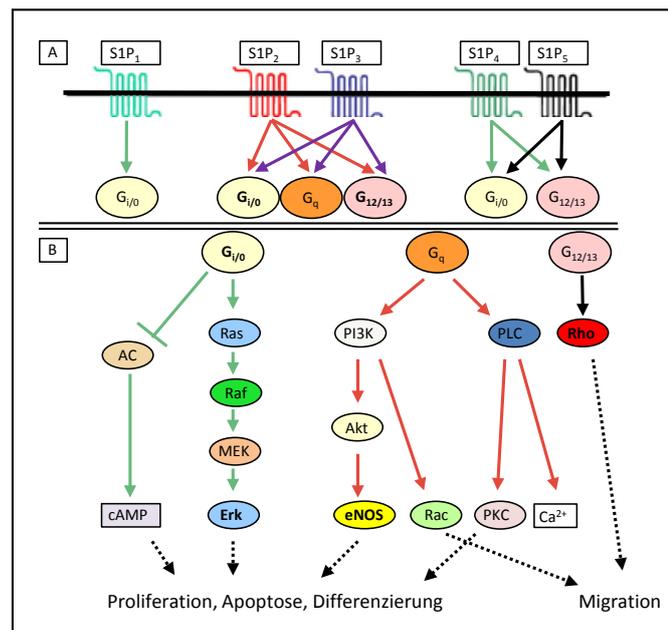


Abb. 3: Signalwege von Sphingosin-1-Phosphat (S1P).

(A) Extrazellulär kann S1P an die fünf verschiedenen G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren S1P₁₋₅ binden, die an G_{i/o}, G_q und G_{12/13} koppeln und die Signale an nachgeschaltete Signalwege weiterleiten. (B) Die S1P-Rezeptoren regulieren u.a. die Phospholipase C (PLC), die Adenylatzyklase (AC), die Protein Kinase C (PKC), *extracellular signal regulated kinase* (ERK), Rac und Rho. Modifiziert nach Brinkmann et al. [71].

Der S1P₁-Rezeptor wird vermehrt in Milz, Hirn, Herz, Lunge, adipösem Gewebe und der Leber exprimiert und ist besonders bei der Gefäßneubildung während der embryonalen Entwicklung von Bedeutung. Ein systemischer *knockout* dieses Rezeptorsubtyps ist aufgrund fehlerhafter Gefäßbildungen nach Embryonaltag 12,5 bis 14,5 letal.

Der S1P₂-Rezeptor wird wie der S1P₁-Rezeptor ubiquitär exprimiert. Er induziert die Zellproliferation und hemmt die Migration, da er am effektivsten an G_{12/13}-Signalwege koppelt und die kleine GTPase Rho aktiviert [72]. S1P₂-Rezeptor *knockout*-Mäuse haben einen anderen auffälligen Phänotyp. Sie verlieren 14 Tage nach der Geburt das Gehör und entwickeln einen Defekt der *Stria vascularis*, der sich in einer von der Basis zum Apex verlaufenden Degeneration der Haarzellen im Cortischen Organ der Cochlea und einem Verlust der Neuronen des Spiralganglions manifestiert. So sind die Mäuse taub und haben Gleichgewichtsstörungen [73].

Der S1P₃-Rezeptor wird verstärkt auf Herzmuskelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert und koppelt neben G_{i/o} und G_q am effektivsten an G_{12/13}. Er vermittelt viele Effekte bezüglich der Gefäße. So führt eine Aktivierung des S1P₃-Rezeptors zu einer arteriellen Vasokontraktion [74]. Abgesehen von einer leicht verminderten Fertilität ist der Phänotyp dieses *knockout* weitgehend unauffällig.

Der in Lunge und im lymphatischen Gewebe vorkommende S1P₄-Rezeptor inhibiert sowohl die Proliferation als auch die Sekretion von Zytokinen in Immunzellen [75-76]. Ähnlich wie der S1P₄-Rezeptor zeigt der S1P₅-Rezeptor ein sehr eingeschränktes Expressionsmuster, welches sich auf das Gehirn und die Haut beschränkt. Über die genaue Funktion dieses Rezeptors ist bis heute nicht viel bekannt. Er ist für die Auswanderung von NK-Zellen wichtig [77] und er hemmt die Migration von Oligodendrozyten-Progenitorzellen [78].

1.1.5 Die Rolle von Sphingolipiden bei Nierenerkrankungen

Sphingolipide spielen neben ihrer Funktion als strukturelle Komponente von Zellmembranen eine wichtige Rolle als inter- und intrazelluläre Signalmoleküle, die an der Regulation elementarer Zellprozesse beteiligt sind. Zahlreiche Studien der letzten Jahre zeigen, dass eine Störung im Lipidstoffwechsel zur Entstehung und Progression vieler Erkrankungen führt. In der Niere betreffen Erkrankungen entweder das Nierengewebe (Ort der Harnbildung) oder das Sammellager (Nierenbecken oder harnableitende Wege).

Die Niere der Wirbeltiere ist ein paarig angelegtes Organ, das in zwei Regionen, eine äußere Rindenschicht (Cortex), die von einer Bindegewebskapsel (Nierenkapsel) umgeben ist und eine innere Markschiicht (Medulla) unterteilt wird. Im Organismus übernimmt die Niere wichtige Funktionen. Sie reguliert den Wasser- und Salzhaushalt, überwacht und

steuert den Säure-Basen-Haushalt und dient der Entgiftung des Körpers durch Ausscheidung schädlicher Stoffwechselprodukte des Purin- und Stickstoff-Stoffwechsels oder von Fremdstoffen über den gebildeten Harn. Außerdem produziert die Niere wichtige Hormone und Gewebefaktoren wie Erythropoietin, Angiotensin II (Ang II), Calcitriol und Prostaglandine und kontrolliert den arteriellen Blutdruck. Die anatomischen und funktionellen Einheiten der Wirbeltierniere bezeichnet man als Nephrone. Sie bestehen aus einem langen Tubulus (Rückresorption und Sekretion) und dem Malpighi-Körperchen (Ultrafiltration und Primärharnbildung). Letzteres besteht aus dem Glomerulum, welches von der Bowman-Kapsel ummantelt wird. In der spezialisierten Struktur der Glomerula findet man vier verschiedene Zelltypen (Abb. 4). Man unterscheidet zwischen den Endothelzellen, die die Kapillaren der Glomerula auskleiden, den perizytenähnlichen Mesangiumzellen, die die Räume zwischen den Kapillaren auskleiden, sowie den viszeralen Epithelzellen (Podozyten) und den parietalen Epithelzellen, die die der Bowman-Kapsel bilden. Die Mesangiumzellen sind von einer bindegewebsartigen Extrazellulärmatrix, dem Mesangium, umgeben. Diese enthält Mikrofibrillen, Kollagen vom Typ IV, V und VI, Proteoglykane und Fibronectin und dient als Stabilisator der Kapillarwände [79].

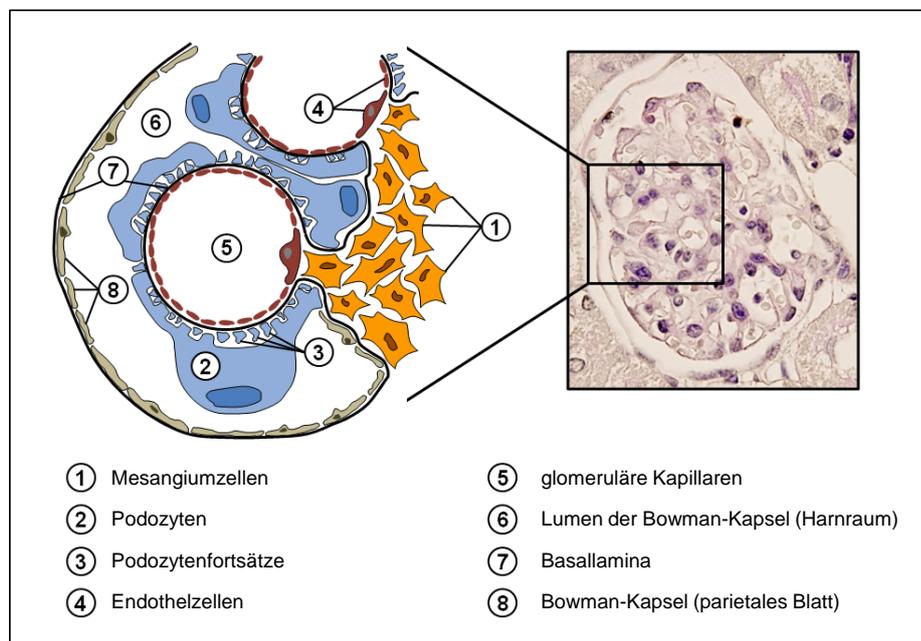


Abb. 4: Schematischer Aufbau und Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbung eines Glomerulums.

Im linken Bild ist der Aufbau eines Glomerulums mit den vier verschiedenen Zelltypen in den Glomerula schematisch dargestellt. Dazu zählen die Endothelzellen, die die Kapillaren der Glomerula auskleiden, die perizytenähnlichen Mesangiumzellen, die die Räume zwischen den Kapillaren auskleiden, sowie die viszeralen Epithelzellen (Podozyten) und die parietalen Epithelzellen, die die Bowman-Kapsel bilden. Im rechten Bild ist die immunohistochemische PAS-Färbung eines Glomerulums von einem Paraffinschnitt zu sehen. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Mayer's Hämalaun.

Neben ihrer Funktion über Ang II und andere vasoaktive Substanzen den Blutfluss der glomerulären Kapillaren zu modifizieren, können Mesangiumzellen Immunglobuline phagozytieren und sind am Umsatz der glomerulären Basallamina durch Aufnahme der abzubauenen Komponenten beteiligt. Zudem spielen Mesangiumzellen eine zentrale Rolle bei Entzündungsreaktionen in der Niere. Unter entzündlichen Bedingungen werden sie von invadierenden Immunzellen wie Neutrophilen und Makrophagen aktiviert. Eine solche Aktivierung der Mesangiumzellen führt zum einen zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen und zum anderen zu einer gesteigerten Synthese pro-entzündlicher Mediatoren wie IL-1 β und TNF- α . Diese sezernierten Zytokine können wiederum Mesangiumzellen anregen selbst bioaktive Moleküle wie Eikosanoide, NO, Wachstumsfaktoren oder entzündlich wirkende Zytokine zu produzieren. Darüber hinaus führt die Aktivierung der Mesangiumzellen unter diesen Bedingungen zu einer vermehrten Produktion von extrazellulären Matrixkomponenten. Unter chronischen Bedingungen tragen diese Mechanismen entscheidend zur Entstehung einer Glomerulosklerose bei, die zu einem Nierenversagen führen kann [80-81].

In den letzten Jahren haben sich etliche Studien mit dem Effekt von S1P auf die verschiedenen Zelltypen des Glomerulums beschäftigt, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese zahlreicher chronischer, renaler Erkrankungen wie der diabetischen Nephropathie (DN) und von Glomerulonephritiden spielen. Die DN zählt zu den häufigsten Nierenerkrankungen und entsteht als Spätkomplikation nach jahrelangem Diabetes Mellitus. Sie wird als häufigste Ursache eines Nierenversagens in den Industrienationen angesehen und wird durch eine erhöhte Proteinausscheidung im Urin (Albuminurie) sowie einer verminderten glomerulären Filtrationsrate charakterisiert. Etwa 30 % der Patienten des Typ 1 Diabetes und 40 % der Patienten des Typ 2 Diabetes sind davon betroffen [82]. Durch einen dauerhaft auftretenden hohen Blutzuckerspiegel werden im Laufe der Zeit die Blutgefäße im Körper geschädigt. Im Glomerulum kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran, einer Verbreiterung des Mesangiums und einer anschließenden Sklerosierung. Im Endstadium kommt es zum vollständigen Funktionsverlust der Niere und der Patient wird dialysepflichtig. Pharmakologisch werden Arzneistoffe wie ACE-Inhibitoren oder AT₁-Blocker eingesetzt, die neben ihrer blutdrucksenkenden Funktion zusätzlich noch nephroprotektive Wirkungen haben sollen. Ihre Wirkung ist wahrscheinlich auf eine verminderte Bildung des profibrotischen Zytokins TGF- β zurückzuführen [83]. Allerdings ist es oft nicht möglich den weiteren

Verlauf der Nephropathie aufzuhalten oder zu heilen. Zwar existieren etliche antifibrotische Ansatzpunkte, die aber noch nicht erfolgreich in der Therapie eingesetzt werden können [82]. In diesem Zusammenhang konnte Geoffroy *et al.* (2005) in einem durch Streptozotozin (STZ) induzierten Diabetes-Mausmodell zeigen, dass die SK-1 Aktivität und SIP-Spiegel in isolierten Glomerula nach einer 4-tägigen STZ-Behandlung hochreguliert waren. Ausgehend von diesen Daten postuliert diese Gruppe eine Beteiligung von Sphingolipidmetaboliten während der Frühphase einer DN [84]. Auch Ren *et al.* (2009) konnte eine Steigerung der SK-1-Expression im Krankheitsmodell der durch STZ induzierten DN beobachten, die anti-fibrotisch während Fibroseprozessen wirkt [67]. Die Beeinflussung des SK-1/SIP-Signalwegs könnte somit eine neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung von chronischen Nierenerkrankungen und der Fibrose sein.

Bei der Glomerulonephritis (GN) handelt es sich um eine entzündliche Veränderung der Glomerula, die eine der Hauptursachen für ein dialysepflichtiges, chronisches Nierenversagen darstellt. Die Klassifikation von Glomerulonephritiden orientiert sich an der Ätiologie, der Histologie und am klinischen Verlauf (akut oder chronisch) und ist durch die Aktivierung von Mesangiumzellen gekennzeichnet. Die Aktivierung dieser Zellen führt zu einer gesteigerten Proliferation, Synthese pro-entzündlicher Mediatoren und zu einer vermehrten Produktion von extrazellulären Matrixkomponenten. Bei einer akuten GN kommt es innerhalb weniger Stunden bis Tage zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion. Die Hauptursache für ein akutes Nierenversagen sind Durchblutungsstörungen infolge einer Blutvergiftung, Entzündungen des Nierengewebes, Infektionen durch Bakterien oder Viren, immunologisch bedingte Entzündungsprozesse der Niere sowie durch bestimmte Medikamente. Zudem kann eine Störung im Harnabfluss eine akute Niereninsuffizienz hervorrufen, die durch Tumore, Nierensteine oder eine vergrößerte Prostata entsteht. Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch die Ausscheidung von Eiweiß und geringen Blutmengen im Urin. Zusätzlich können sich ein Bluthochdruck und Ödeme entwickeln. Bei der chronischen GN handelt es sich um eine langsam fortschreitende Form der Entzündung, die über Monate bis Jahre zu einer zunehmenden Verschlechterung der Nierenfunktion durch verschiedenste Schäden an den Glomerula führt. Eine chronische GN ist meist nicht mehr heilbar und die Behandlung zielt vor allem darauf ab, den nierenbedingten Bluthochdruck gut einzustellen und die Niere in ihrer Ausscheidungsfunktion zu unterstützen.

Die gemeinsame Endstrecke von DN und GN sowie zahlreicher weiterer Nierenerkrankungen ist der fibrotische Umbau der Niere. Beim Krankheitsbild der Fibrose handelt es sich um eine Gewebeveränderung, die durch die pathologische Vermehrung von Bindegewebszellen und Matrixdeposition gekennzeichnet ist. Dabei wird das Gewebe des betroffenen Organs verhärtet und es entstehen narbige Veränderungen, die im fortgeschrittenen Stadium zur Einschränkung der jeweiligen Organfunktion führen. Ein Schlüsselfaktor von Fibroseprozessen ist der Wachstumsfaktor TGF- β , der auch die Expression und die Aktivität der SK-1 erhöht. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass TGF- β nicht nur die Aktivität der SK-1 in humanen Podozyten, sondern auch die Expression des pro-fibrotischen Bindegewebswachstumsfaktors CTGF induzieren kann [67]. CTGF gehört zur Familie der CNN-Proteine und der Name CCN ergibt sich aus den Anfangsbuchstaben der ersten bekannten Mitglieder dieser Familie, wobei das erste C für *Cystein-Rich 61* (CYR61/CCN1), das zweite C für CTGF/CCN2 und das N für *Nephroblastoma Over Expressed* (NOV/CCN3) steht. Neben TGF- β kann auch S1P die CTGF-Bildung forcieren. Zudem wurde bei verschiedenen Fibrose-Modellen eine erhöhte CTGF-Konzentration gefunden [85]. Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass in den USA 13 % der erwachsenen Bürger an einer chronischen Nierenerkrankung leiden und dass ca. 45 % aller Todesfälle mit fibrotischen Erkrankungen vergesellschaftet sind [86]. Daher ist es wünschenswert neue Ansatzpunkte für die Therapie zu finden, die das Fortschreiten einer Fibrose begrenzen. Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) γ -Agonisten neben ihrer Funktion als Insulin-Sensitizer auch anti-inflammatorisch und anti-fibrotisch wirken können [87]. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung von PPAR γ -Agonisten auf den Sphingolipidstoffwechsel untersucht um einen weiteren Erklärungsansatz für die bekannten reno-protectiven Effekte von Thiazolidindionen (TZDs), insbesondere auf deren anti-fibrotische Wirkung zu erhalten.

1.2 *Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)*

PPARs sind intrazelluläre, Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die auf Expressionsebene eine Vielzahl von Genen regulieren. Sie bilden mit 47 weiteren Rezeptorgruppen eine Unterfamilie der nukleären Hormonrezeptoren, die zur Gruppe C der Unterfamilie 1 gehören (NR1C). PPARs spielen unter anderem bei der Entstehung von Erkrankungen wie Diabetes, Fettleibigkeit, Arteriosklerose und Krebs eine entscheidende Rolle. Sie erhielten ihren Namen Anfang der 90er Jahre, da sie erstmals in der Leber von Nagetieren nachgewiesen wurden und dort zur Proliferation von Peroxisomen führen [88]. Bis heute konnten drei verschiedene PPAR-Subtypen identifiziert werden, die sich in ihrer lokalen Expression, Ligandenbindung und biologischen Funktion unterscheiden: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) und PPAR γ (NR1C3) [89]. Vom Subtyp PPAR γ sind im menschlichen Organismus zwei Isoformen, PPAR γ 1 und PPAR γ 2 bekannt, die durch unterschiedliche Spleiß-Varianten des selben Gens entstehen, sich aber durch ein zusätzliches Motiv von 30 AS am N-Terminus von PPAR γ 2 unterscheiden. Beide Isoformen können im Fettgewebe und zu geringen Mengen im Skelettmuskel aufgefunden werden, wobei PPAR γ 2 fast ausschließlich im Fettgewebe exprimiert wird. PPAR γ 1 wird zusätzlich in Leber und Herz exprimiert [90]. Als molekulare Sensoren aktivieren PPARs Zielgene in Antwort auf verschiedene natürliche oder synthetische Liganden. Die meisten identifizierten Zielgene implizieren Effekte auf den Glucose- und Lipidstoffwechsel und den gesamten Energiehaushalt des Körpers. Zu den natürlichen Liganden zählen sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren, Eicosanoide und Prostaglandine. Gesättigte Fettsäuren wie Stearin- und Palmitinsäure binden vorwiegend an PPAR α . Diese sind jedoch eher schwache Liganden im Vergleich zu den ungesättigten Fettsäuren Linolsäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure, welche an alle drei PPAR-Subtypen mit EC₅₀-Werten im mikromolaren Bereich binden. Eicosanoide, die als PPAR α -Agonisten fungieren, sind die 8(S)-Hydroxyeicosatetraensäure (HETE) und Leukotrien B₄ (LTB₄). An PPAR γ binden bevorzugt polyungesättigte Fettsäuren und Eicosanoide wie 15-Desoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), die pathophysiologisch oxidierten Metabolite der Linolsäure 9-HODE und 13-HODE (9/13-cis-Hydroxyoctadecadiensäure) sowie 8(S)-HETE. Zu den synthetischen PPAR α -Liganden zählt die Wirkstoffklasse der Fibrate (Clofibrat, Benzafibrat, Fenofibrat, WY-14-643 und GW 2331/2433). PPAR γ lässt sich durch die synthetischen TZDs Troglitazon (TRO), Rosiglitazon (RSG), Pioglitazon (PIO)

und Ciglitazon aktivieren und PPAR β/δ durch die Wirkstoffe L-165041, GW 501516 und GW 0742 [91, 92].

PPAR α wurde erstmals 1990 durch Isseman und Green (1990) [88] kloniert und wird hauptsächlich in der Leber, der Niere, dem Darm und dem Herz exprimiert [93]. Zu den Aufgaben von PPAR α gehört in erster Linie die Regulation der Energiehomöostase und des Fettmetabolismus durch die Stimulation der Fettsäureoxidation, Gluconeogenese und Ketonkörpersynthese des Fettsäurestoffwechsels [94]. Zudem ist PPAR α im Lipoproteinaufbau und an der Kontrolle der inflammatorischen Antwort beteiligt [95-97]. PPAR β/δ ist notwendig für die Entwicklung der Plazenta und des Darms und wird deswegen in diesen Geweben hoch exprimiert. Ansonsten ist er in fast allen Geweben in niedrigen Konzentrationen vorhanden [98]. Zu weiteren biologischen Funktionen zählen neben der Regulation des Fettstoffwechsels und der Zellproliferation auch die Differenzierung von Keratinozyten während der Wundheilung und der Implantierung des Embryos in die Plazenta [99].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Subtyp PPAR γ , der im Lipid- und Glukosestoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Er wird verstärkt im Fettgewebe exprimiert, gefolgt von der Niere, der Leber und dem Darm [91]. Im Muskel kommt er kaum vor. PPAR γ ist ein zentraler Regulator in der Adipozytendifferenzierung und der Aufrechterhaltung spezifischer Fettzellfunktionen wie der Fettspeicherung in weißem Fettgewebe und dem Energieverbrauch in braunem Fettgewebe. Zudem übt er wichtige regulatorische Funktionen in der Lipogenese aus, spielt eine wichtige Rolle während der Inflammation, Arteriosklerose und bei bestimmten Krebsformen. PPAR γ beeinflusst auch die Expression von Leptin und Resistin und damit die Leptin-induzierte Lipolyse und Fettsäureoxidation. Speziell in der Niere führt die Aktivierung von PPAR γ zu einer Verringerung einer experimentell induzierten GN in Mäusen und Ratten, indem die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen unterdrückt wird. Zudem kommt es bei Patienten, die an einer DN leiden durch die PPAR γ -Aktivierung zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes [100]. Neben Fettsäuren, 15d-PGJ₂ und TZDs wird PPAR γ auch von nicht TZDs wie beispielsweise L-796449 aktiviert [91].

1.2.1 Aufbau, Struktur und Wirkung von PPAR γ als Transkriptionsfaktor

Der strukturelle Aufbau von PPARs ist weitgehend homolog zu dem von anderen Mitgliedern der nukleären Hormonrezeptoren. Sie bestehen aus fünf Domänen (A/B-F), die eine konservierte Sequenz und Funktion besitzen. 1998 wurde die Struktur von PPAR γ durch Nolte *et al.* [101] mittels der Röntgen-Raman-Streuungs-Methode aufgeklärt. Am N-Terminus befindet sich die Liganden-unabhängige Aktivierungsdomäne A/B, die auch als *activation function 1*, AF-1, bezeichnet wird. Darauf folgt (C) eine aus zwei Zink-Finger-Motiven bestehende DNA-Bindungsdomäne, DBD, die es dem Protein ermöglicht mit der DNA zu interagieren um an das *peroxisome proliferator response element* (PPRE) Bindungsmotiv im Promotor zu binden. Die daran anschließende Region D wird als *hinge*-Domäne HD bezeichnet, die als flexibles Bindeglied zwischen der DNA-Bindungsdomäne und der Liganden-Bindungsdomäne fungiert. Dadurch wird dem Protein eine Flexibilität hinsichtlich der Fähigkeit zur Liganden- und DNA-Bindung erlaubt. Außerdem dient sie als Bindestelle für Cofaktoren und ist in der Lage mit anderen Proteinen eine direkte Protein-Interaktion einzugehen um so verschiedene Signalwege zu beeinflussen. Am C-Terminus E/F befindet sich die Liganden-Bindungsdomäne LBD, die eine Liganden-abhängige Aktivierungsdomäne *activation function 2*, AF-2, enthält. Die verschiedenen PPAR-Subtypen sind zu ca. 70 % homolog in der Liganden-Bindungsdomäne und zu ca. 85 % in der DNA-Bindungsdomäne [101].



Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) Domänen.

Die Amino-terminal gelegene A/B-Domäne stellt die Liganden-unabhängige Aktivierungsdomäne *activation function 1*, AF-1, dar. Die Liganden-abhängige Aktivierungsdomäne *activation function 2*, AF-2, befindet sich in der Region F zusammen mit der Liganden-Bindungsdomäne LBD in der Region E am C-terminalen Ende des Proteins. Die Domänen C und E, DNA-Bindungsdomäne DBD und Liganden-Bindungsdomäne LBD, sind am stärksten konserviert. Die Domäne D besteht aus einer variablen *hinge*-Domäne HD und spielt bei Konformationsänderungen eine wichtige Rolle.

Die Voraussetzung für die Bindung von PPAR γ an die DNA ist dessen Aktivierung durch die Bindung eines Liganden an die Liganden-Bindungsdomäne, sowie die Heterodimerisierung mit dem 9-*cis*-Retinoid X Rezeptor (RXR). Dieser gehört wie auch PPAR γ zu den nukleären Hormonrezeptoren und wird durch spezifische Liganden

aktiviert. Durch die Ligandenbindung an PPAR γ dissoziiert der Corepressorkomplex *nuclear receptor corepressor/silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors* NCoR/SMRT vom Proteinkomplex PPAR γ /RXR ab, der durch die Assoziation mit HDACs die Gentranskription verhindert. Gleichzeitig werden mehrere Coaktivatoren wie beispielsweise SRC1 (*steroid receptor coactivator 1*) und CBP (*cAMP response element binding protein/300*) rekrutiert, die durch ihre Histonacetyltransferaseaktivität die Chromatinverpackung reorganisieren und so dem entstandenen Proteinkomplex die Bindung an bestimmte PPRE Sequenzen in der Promotorregion von Genen ermöglicht. PPREs sind Motive, in denen jeweils zwei aufeinanderfolgende spezifische Hexanukleotid-Sequenzen durch 1 bis 2 beliebige Nukleotide voneinander getrennt sind (5'-AGGTCA N(N) AGGTCA-3') [102]. Diese Basenabfolge wird als *direct repeat-1*, DR-1, bezeichnet.

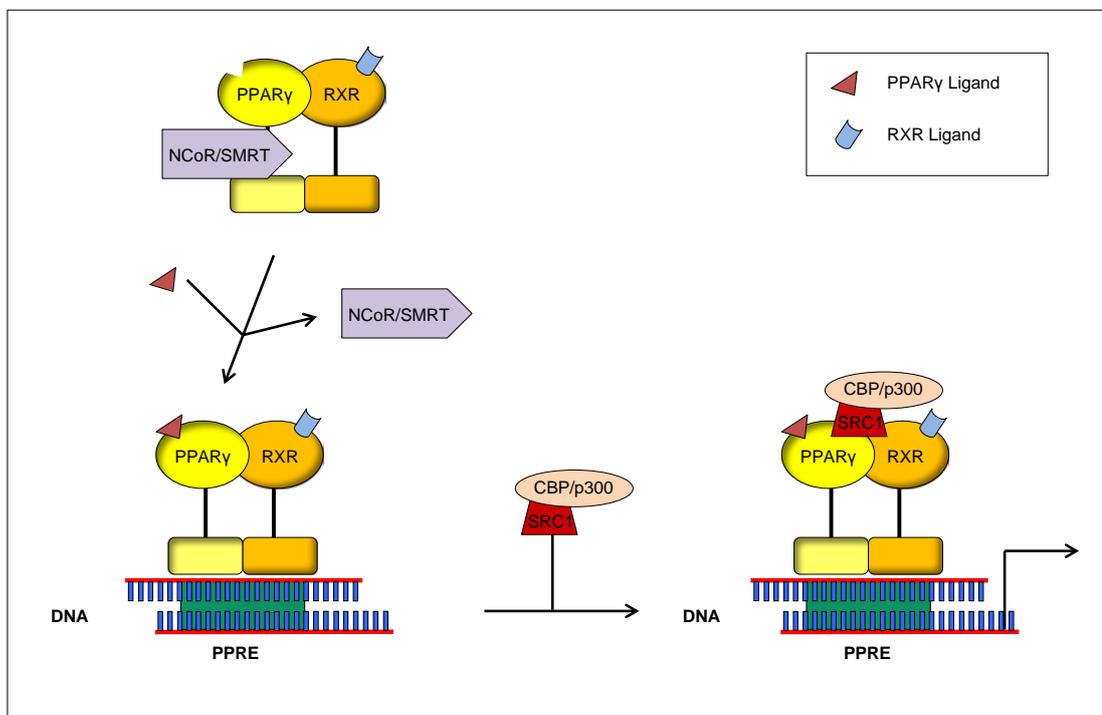


Abb. 6: Peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ)-vermittelte Genexpression.

Nach der Bindung eines PPAR γ -Liganden wie beispielsweise Troglitazon (TRO) oder Rosiglitazon (RSG) an die PPAR γ -Liganden-Bindungsdomäne, kommt es zur Ausbildung eines Heterodimers mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), der bereits durch einen Liganden aktiviert wurde. Mit der Bindung des Liganden an PPAR γ dissoziiert gleichzeitig der Corepressorkomplex *nuclear receptor co-repressor/silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors* NCoR/SMRT vom Heterodimer PPAR γ /RXR, der das PPAR γ /RXR-Heterodimer in die Lage versetzt an das *peroxisome proliferator response element* (PPRE) im entsprechenden Promotorbereich zu binden. Die Coaktivatoren *steroid receptor co-activator 1* (SRC1) und *cAMP response element binding protein/p300* (CBP) werden zur vollständigen Transaktivierung des Proteinkomplexes rekrutiert. Durch ihre Histonacetyltransferaseaktivität reorganisieren diese Coaktivator Komplexe ihre die Chromatinverpackung und erlauben so der Transkriptionsmaschinerie den Zugang zur Promotorregion, wodurch die Transkription PPAR γ gesteuerter Gene gestartet wird.

In seiner aktiven Form ist PPAR γ nicht nur in der Lage die Expression von bestimmten Zielgenen zu induzieren, sondern kann auch durch eine direkte Interaktion mit anderen Proteinen in verschiedene Signalwege eingreifen und somit eine anti-inflammatorische Immunantwort auslösen. Diese Fähigkeit wird als Transrepression bezeichnet.

1.2.2 Thiazolidindione (TZDs)

TZDs oder Glitazone, sind eine Gruppe von synthetischen PPAR γ -Liganden, die oral zur Behandlung des Diabetes Mellitus Typ 2 angewendet werden. Nach ihrer Wirkungsweise werden sie auch als Insulin-Sensitizer bezeichnet, da sie die Empfindlichkeit der Zellen von Leber, Muskulatur und Fettgewebe für Insulin erhöhen. Dadurch werden vermehrt Fettsäuren und Glukose in die Zellen aufgenommen und im Stoffwechsel umgesetzt. Zur Gruppe der TZDs gehören TRO, RSG, PIO und Ciglitazon, die im Gegensatz zu anderen PPAR-Liganden selektiv für PPAR γ sind. Alle Glitazone weisen das charakteristische chemische Thiazol-2,4-dion Grundgerüst mit einer aziden Kopfgruppe, einem zentralen Aryl-Spacer und einem lipophilen Rest auf. Als erster Vertreter der TZDs wurde 1997 TRO zugelassen. Jedoch wurde diese Substanz aufgrund von schwerer Hepatotoxizität mit letalem Ausgang nach einiger Zeit wieder vom Markt genommen [103]. In Deutschland war RSG bis 2010 als Begleittherapie zu Metformin oder Sulfonylharnstoffen zur Behandlung des Typ-2-Diabetes bei Patienten zugelassen, die unter Metformin allein keine befriedigenden Blutzuckerwerte erzielten oder bei denen Metformin nicht gegeben werden konnte. PIO ist zwar seit dem Jahr 2000 in Deutschland noch zugelassen, zeigt aber wie RSG signifikante Nebenwirkungen wie Flüssigkeitsretention mit verbundenen Ödembildungen, Gewichtszunahme und Herzinsuffizienz. Zudem steht PIO seit 2011 im Verdacht das Blasenkrebsrisiko zu erhöhen (Ärzteblatt 06/2011). Um diese Nebenwirkungen zu minimieren wurden neue synthetische PPAR γ -Liganden entwickelt, die nicht das TZD-Strukturmotiv aufweisen und als Nicht-TZD-Typen bezeichnet werden. Zu ihnen zählen Metaglidase (Metabolex), FMOC-Leu, nTZDpa, SPPARM12 und T131, die sich zurzeit in Phase II bzw. III klinischer Studien befinden und keine der beschriebenen Nebenwirkungen hervorrufen. Zudem konnte die Arbeitsgruppe von Spiegelman [104] trotz aller bekannten Nachteile von TZDs neue Erkenntnisse für eine mögliche Behandlung von Diabetes mit PPAR γ -Liganden zeigen, indem diese geringfügig in ihrer Struktur geändert werden [105-106]. Somit können PPAR γ -Liganden aus der

Gruppe der Nicht-TZD-Typen und strukturell veränderte TZDs neue potentielle Therapeutika als Ersatz für die bisher verwendeten TZDs darstellen. Zudem zeigen Studien, dass TZDs neben ihrem Einsatz als antidiabetische Medikamente auch als potentielle Therapeutika zur Behandlung von Krebs, Arteriosklerose, neurodegenerativen Krankheiten sowie zahlreichen chronischen, sowohl diabetisch als auch nicht-diabetisch induzierten Nierenerkrankungen wie der DN, der GN, der Ischämie-Reperfusion Schädigung, der hypertensiven Nephropathie, der durch Cyclosporin-A induzierten Nierenstörung und der Fibrose eingesetzt werden können [107]. Thomas *et al.* [108] konnte zeigen, dass in durch STZ induzierten Diabetes-Mäusen RSG eine Glomerulosklerose sowie tubulointerstitielle Schäden verringerte und das im Urin ausgeschiedene Albumin gesenkt wurde. Auch in anderen renalen Krankheitsmodellen wie im Fall von *db/db*-Mäusen, Zucker-Fett-Ratten und OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fett)-Ratten, die eine DN aufweisen, konnten mit TZDs ähnliche protektive Effekte beobachtet werden, indem die glomeruläre Hypertrophie unterdrückt, die Synthese von mesangialer Matrix verringert und die Proteinurie sowie Nierenfunktionen verbessert werden.

Die Mechanismen der PPAR γ -vermittelten reno-protectiven Effekte sind vielfältig. Zum einen können sie anti-inflammatorisch und anti-fibrotisch wirken. In glomerulären Mesangiumzellen inhibiert RSG die Funktion von Makrophagen und unterdrückt die TGF- β induzierte Kollagen I- und Fibronectinexpression. PPAR γ -Agonisten zeigen auch vaskulär protektive Effekte indem sie die Proliferation von glatten Muskelzellen inhibieren. Zudem unterdrücken sie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems in Nieren und wirken anti-apoptotisch [99].

1.3 Eicosanoide

Eicosanoide sind Oxidationsprodukte des Stoffwechsels mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 20 C-Atomen, die in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und als Immunmodulatoren und Neurotransmitter an entzündlichen Prozessen im Körper beteiligt sind. Zur Familie der Eicosanoide gehören die Prostaglandine, die Prostacycline, die Thromboxane, die Leukotriene, die Hydroxy-Eicosatetraensäuren und die Epoxyeicosatriensäuren, die alle über G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren wirken. Die zur Synthese notwendigen Fettsäuren werden aus der Zellmembran durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) freigesetzt und stehen dann als Substrate

für Cyclooxygenasen (COX) (Prostaglandinsynthese), Lipoxygenasen (Leukotriensynthese) und Epoxygenasen (Epoxyeicosatriensynthese) zur Verfügung. Thromboxane werden aus Prostaglandinendoperoxiden mit Hilfe von Thromboxan-Synthasen synthetisiert. Bei Epoxyden handelt es sich um Stoffwechselprodukte der Cytochrom P-450 Epoxygenasen. Dabei entstehen durch Oxygenierung aus Arachidonsäure (AA) Epoxyeicosatriensäuren. Unterschieden werden Eicosanoide danach, aus welchem Grundstoff sie hergestellt werden. Zu den drei Grundstoffen zählen die Dihomogammalinolensäure, die AA und die Eicosapentaensäure. Nach der Hauptwirkung der Eicoanoide unterscheidet man drei Serien: Serie 1 aus Dihomogammalinolensäure, Serie 2 aus AA und Serie 3 aus Eicosapentaensäure synthetisierte Eicosanoide. Während Eicosanoide aus der Serie 1 und 3 gegen Entzündungen und gegen die Schmerzleitung wirken, fördern Eicosanoide aus der Serie 2 diese Prozesse [109].

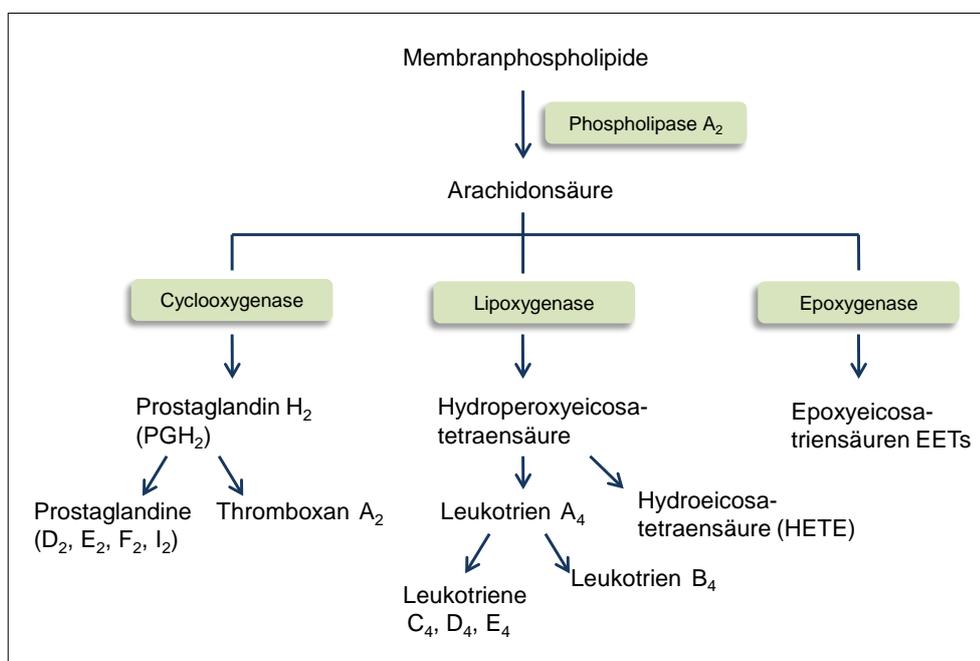


Abb. 7: Synthesewege der Eicosanoide. Modifiziert nach Gambaro [109].

Die zur Eicosanoidsynthese notwendigen Fettsäuren werden aus den Zellmembranen durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) freigesetzt und stehen dann als Substrate für Cyclooxygenasen (COX) (Prostaglandinsynthese), Lipoxygenasen (Leukotriensynthese) und Epoxygenasen (Epoxyeicosatriensynthese) zur Verfügung. Die für die jeweilige Umwandlung verantwortlichen Enzyme sind grün hinterlegt.

1.3.1 Biosynthese und Funktion von Prostaglandinen

Prostaglandine sind eine Gruppe von Gewebshormonen, die erstmals 1935 durch den schwedischen Wissenschaftler von Euler beschrieben wurden [110]. Der Name der Prostaglandine leitet sich aus dem englischen „*prostate gland*“ (Prostata Drüse) ab, da man ursprünglich annahm, dass sie in der Prostata gebildet werden. Sie zählen ebenso wie die Arachidonsäureabkömmlinge Prostacyclin, Thromboxan und Leukotriene zu den Eicosanoiden. Da alle genannten Substanzgruppen bis auf die Leukotriene von der Prostansäure, einer natürlich nicht vorkommenden Säure abstammen, werden diese auch als Prostanoiden bezeichnet. Das chemische Grundgerüst der Prostaglandine besteht aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit 20 C-Atomen.

Prostaglandine werden normalerweise nicht in Zellen oder Geweben gespeichert, sondern *de novo* nach hormonellen oder anderen Reizen wie beispielsweise LPS synthetisiert [111-113]. Der erste Schritt der Prostaglandinbiosynthese ist die Freisetzung von AA aus der Phospholipidmembran einer Zelle durch die PLA₂. Zur Familie der PLA₂ zählen die kalziumabhängige zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) sowie die sekretorische Phospholipase A₂ (sPLA₂). Die kalziumunabhängige Phospholipase A₂ (iPLA₂) und der Plättchen-aktivierende-Faktor-Acetylhydrolasen, PAF-AH sind nicht kalziumabhängig [112]. Die von den PLA₂ hydrolysierte AA dient als Substrat für die COX-1 und -2 [113], die auch als PGH-Synthase-1 bzw. -2 bezeichnet werden und ein an der Membrannenseite des ER lokalisiertes, bifunktionelles Enzym mit einer COX- und einer Peroxidase-Aktivität ist. In einer zweistufigen Reaktion kommt es zunächst durch die Cyclooxygenase-Aktivität der COX zur Bildung des Zwischenproduktes Prostaglandin G₂ (PGG₂), das durch die Peroxidase-Aktivität des Enzyms sofort zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) reduziert wird. PGH₂ ist die gemeinsame Vorstufe der Prostaglandine, die zell- bzw. gewebespezifisch mit Hilfe spezieller Prostaglandin-Synthasen gebildet werden. Zu den wichtigsten Prostaglandinen zählen PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} und Prostazyklin PGI₂ sowie das Thromboxan A₂ (TxA₂) [114-115]. Prostaglandine werden über einen Prostaglandintransporter aus der Zelle freigesetzt [116] und können entweder auto- oder parakrin über spezifische GPCRs wirken (EP₁₋₄ für PGE₂, IP für PGI₂, TP für TxA₂, FP für PGF_{2α}, DP für PGD₂). Sie spielen bei verschiedenen Prozessen im Körper wie der Regulation des Wasserhaushaltes, Initiierung von Entzündungsprozessen, Wundheilung, Reproduktion und verschiedener Entwicklungsprozesse eine entscheidende Rolle.

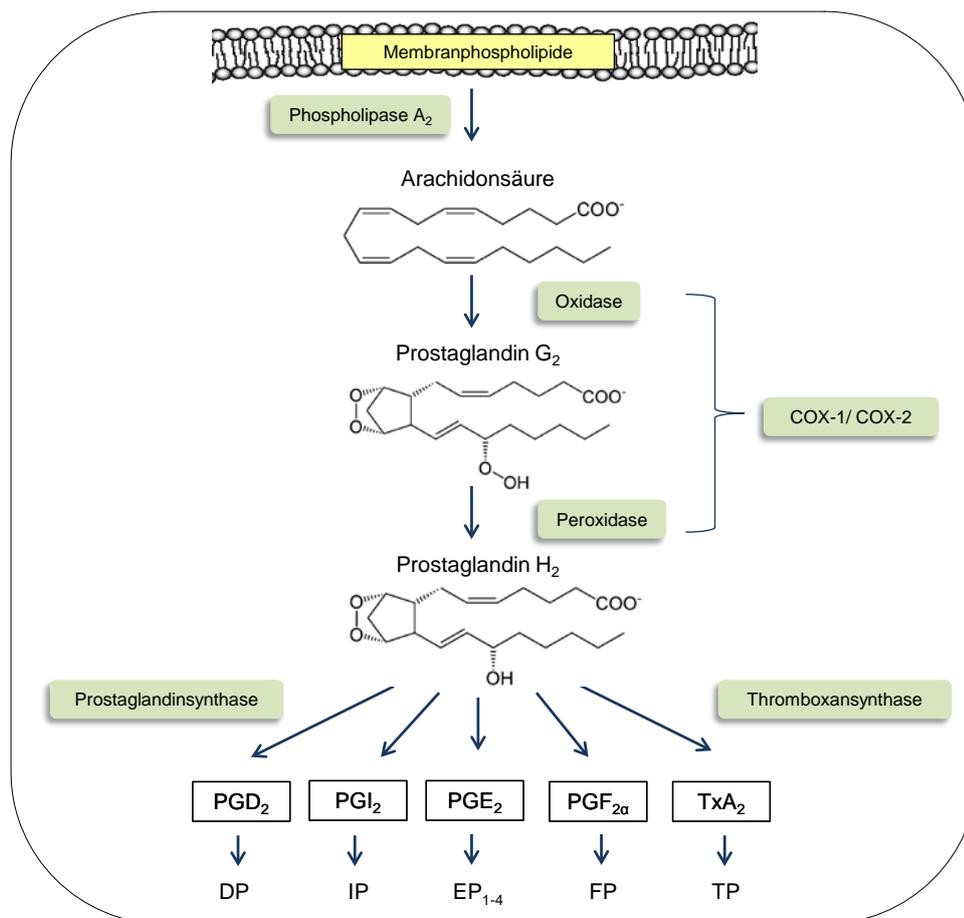


Abb. 8: Schematische Darstellung der Prostaglandin- und Thromboxanbiosynthese.

Dargestellt ist die Umwandlung von Arachidonsäure (AA) in die Prostaglandine PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, Prostacyclin PGI₂ und Thromboxan TxA₂. Die für die jeweilige Umwandlung verantwortlichen Enzyme sind grün hinterlegt. Das bifunktionelle Enzym COX-1 bzw. COX-2 besitzt eine Cyclooxygenase- und eine Peroxidaseaktivität. Cyclooxygenasen katalysieren die Prostaglandin H₂ Synthese, welches anschließend durch die gewebespezifischen Prostaglandinsynthasen zu Prostaglandinen, Prostacyclin und Thromboxan umgewandelt wird. Die synthetisierten Prostaglandine werden über einen Prostaglandintransporter aus der Zelle freigesetzt und entfalten ihre Wirkung über spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren: DP für PGD₂, IP für PGI₂, EP₁₋₄ für PGE₂, FP für PGF_{2α}, TP für TxA₂. Modifiziert nach Gupta *et al.* und FitzGerald GA [117-118].

Unter physiologischen und pathologischen Stimuli sind Podozyten und Mesangiumzellen in der Lage Prostaglandine zu synthetisieren. In der Niere ist das Hauptprodukt des Prostaglandinstoffwechsels PGE₂, welches abhängig von seinen 4 Rezeptoren EP₁₋₄ an den meisten physiologischen Funktionen der Niere beteiligt ist. PGE₂ kommt hauptsächlich im Nierenmark und mit einer etwas geringeren Ausprägung im Nierencortex vor [119]. PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ und TxA₂ werden in der Niere nur wenig gebildet. Sie übernehmen in der Niere eine wichtige Rolle bei der Regulation des renalen Blutflusses, der glomerulären Filtrationsrate, der Salz- und Wasserekkretion, sowie der Reninfreisetzung und damit verbunden dem systemischen Blutdruck [120]. Bei verschiedenen humanen und

experimentell induzierten Glomerulopathien konnten jedoch Änderungen im Prostaglandinmetabolismus nachgewiesen werden [121]. Ein Merkmal der meisten experimentellen wie auch humanen GN-Formen ist ein Absinken der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und die Entwicklung einer Proteinurie. So wurde im Modell der anti-Thy1.1-induzierten mesangioproliferativen GN und in Nieren von Mäusen mit Lupus-Nephritis eine erhöhte renale TxA₂ Konzentration gefunden. Die Inhibierung der TxA₂ Aktivität wiederum führte zu einer Verbesserung der Nierenfunktion, indem die GFR erhöht und die gesteigerte Ausscheidung von Proteinen mit dem Urin verringert wurde. Im Fall einer durch STZ induzierten DN kam es zu einer gesteigerten PGE₂, PGI₂ und TxA₂ Synthese. Durch TxA₂-Inhibitoren wurde die Proteinurie in den beiden zuvor erwähnten Krankheitsmodellen gesenkt und die GFR erhöht [122-123]. Die Tatsache, dass COX-2 *knockout*-Mäuse schwere Nephropathien entwickeln und nicht lebensfähig sind, zeigt die physiologische Bedeutung dieses Enzyms in der Nierenentwicklung. Die Nierenentwicklung dieser Mäuse ist stark beeinträchtigt, da die Glomeruli unterentwickelt bleiben. Es findet keine homologe Verteilung über die Nierenrinde statt und der Anschluss an das Tubulussystem ist nicht gegeben, so dass die meisten Tiere im Alter von ca. 3-4 Monaten am chronischen Nierenversagen sterben [124].

Weitere biologische Funktionen von PGE₂ sowie aller anderen Prostaglandine im Körper sind in Tabelle 1 in einer kurzen Übersicht zusammen gestellt.

Tabelle 1: Prostaglandine und ihre physiologischen Effekte. Nach [125].

Prostaglandin	physiologische Effekte
PGD ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatation • Hemmung der Thrombozytenaggregation • Erschlaffung der glatten Muskulatur von Gastrointestinaltrakt und Uterus
PGE ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Kontraktion der glatten Muskulatur von Bronchien und Gastrointestinaltrakt • Unterdrückung der Säurefreisetzung im Magen • Hemmung der Lipolyse und Neurotransmitterfreisetzung • Förderung der Schleim- und Bicarbonatskretion in Magen und Dünndarm • Blutdrucksenkung • Entstehung von Fieber und Schmerzen

	<ul style="list-style-type: none"> • Hemmung der Histaminfreisetzung sowie der Organabstoßung • verstärkte Uteruskontraktion in der Schwangerschaft und Einleitung der Geburt
PGF ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Kontraktion des Uterus und der Bronchialmuskulatur • Hemmung der Wasserabsorption im Dünndarm
PGI ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatation • Hemmung der Thrombozytenaggregation • Reninfreisetzung • Zunahme der Wasserabsorption im Dünndarm • Sensibilisierung der Schmerzrezeptoren
TxA ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Vasokonstriktion • Einleitung der Thrombozytenaggregation • Starke Kontraktion der Bronchialmuskulatur

1.3.2 Cyclooxygenasen (COX)

COX, auch bekannt als Prostaglandin H-Synthasen, sind die wesentlichen Enzyme während der Prostaglandinsbioynthese, die für die Umwandlung von AA zum Zwischenprodukt PGH₂ verantwortlich sind. Bis heute sind drei Isoformen der COX bekannt: COX-1, COX-2 und COX-3. Bereits 1976 haben verschiedene Forschergruppen die COX-1 aus der Samenblase von Rindern und Schafen isoliert [126-129] und im Jahr 1988 wurde das Enzym von De Witt und Smith und zwei weiteren Laboren kloniert [130-132]. Aufgrund unterschiedlicher Kinetiken von Enzymreaktionen spekulierten Forschergruppen in den 70er Jahren, dass die COX-1 nicht allein für die Prostaglandinbiosynthese verantwortlich sein kann und es eine weitere COX geben müsse [133-134]. Daraufhin wurde zwischen 1988 und 1991 eine weitere Form der COX, die COX-2 entdeckt und kloniert [135-137]. Bei der COX-3 handelt es sich um eine im Hunde Gehirn entdeckte Spleißvariante des COX-1 Gens, die durch Retention des Introns 1 entsteht und 2002 von Chandrasekharan *et al.* entdeckt wurde [137]. Diese Isoform ist vermutlich die Angriffsstelle für den Wirkstoff Paracetamol. Dieselbe Forschergruppe hat außerdem noch zwei weitere, kleinere Spleißvarianten des COX-1 Gens PCOX-1a und PCOX1b beschrieben, deren Funktion jedoch noch unbekannt ist.

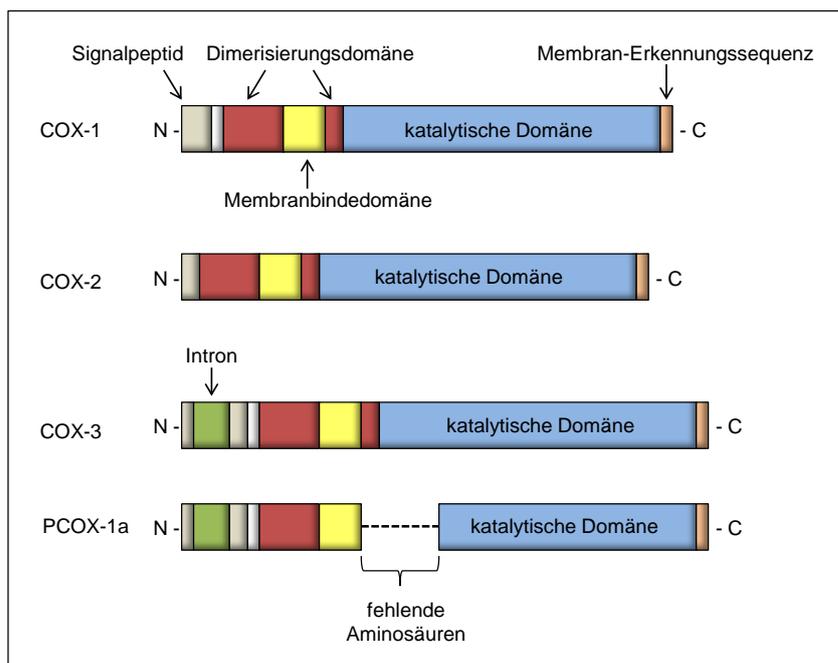


Abb. 9: Struktur der bekannten Cyclooxygenase (COX) Varianten.

Dargestellt sind die funktionellen Domänen der COX-1 und COX-2 sowie die durch alternatives Spleißen entstanden COX-1 Varianten COX-3 und PCOX-1a. Modifiziert nach Simmons *et al.* [138].

Durch nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) lassen sich die COX und damit auch die Prostaglandinbiosynthese pharmakologisch hemmen. Das wohl bekannteste NSAR ist das Salizylsäure-Derivat Aspirin, das die COX-1 und COX-2 irreversibel durch die Bindung an das aktive Zentrum der Enzyme inhibiert. Neuere NSARs wie Rofecoxib oder Celecoxib sind spezifische, reversibel und kompetitive COX-2-Inhibitoren, die nebenwirkungsärmer sind als herkömmliche Vertreter der NSARs wie Indomethacin oder Piroxicam, die beide Isoenzyme hemmen. Die Möglichkeit selektive COX-2 Hemmer zu entwickeln ergibt sich aus einem Konformationsunterschied der aktiven Zentren der beiden Enzyme.

Die COX-1 wird in den meisten Organen konstitutiv exprimiert und produziert als sogenanntes *house-keeping* Enzym Prostaglandine, die weitreichende physiologische Funktionen wie den Schutz der Magenmukosa, der Blutgerinnung oder dem renalen Wasser- und Elektrolythaushalt haben [130, 139]. Sie besteht aus drei unabhängigen Untereinheiten: eine epidermale Wachstumsfaktor-Domäne, eine Membran-Bindungskomponente und eine enzymatische Domäne [128]. Die COX-2 hingegen ist ein induzierbares Protein, welches durch eine Vielzahl unterschiedlicher Reize, wie Wachstumsfaktoren, Zellstress, Zytokine und Entzündungsmediatoren induziert wird. Eine weitere Substanz die in der Lage ist COX-2 zu induzieren, ist S1P [140-143]. COX-2 ist für die erhöhte Prostaglandin Produktion in entzündetem Gewebe verantwortlich und

dadurch an vielfältigen Prozessen des Organismus, wie beispielsweise Schmerz, Fieber, Angiogenese und vor allem bei der Regulation der Immunantwort beteiligt [144-145]. Die zweite Isoform kann aber auch in wenigen Geweben wie der Rattenniere [146], der Mausnieren [147] oder in Teilen des Gehirns in geringen Mengen konstitutiv exprimiert werden und ist dort für physiologische Prozesse (Entwicklung der Niere, Stimulation des Reninsystems) verantwortlich. In der Niere wurde die konstitutiv exprimierte COX-1 überwiegend in den Zellen des Sammelrohrs lokalisiert [148] während die COX-2 in der Nierenrinde in den Zellen der Macula densa und dem dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife sowie in den interstitiellen Zellen des Nierenmarks nachgewiesen wurde [146].

COX sind globuläre, integrale Membranproteine im ER und in der Kernmembran von etwa 600 AS, die aus zwei identischen Monomeren aufgebaut und zu 65 % homolog in ihrer AS-Sequenz sind. COX-1 und COX-2 unterscheiden sich deshalb nicht sehr in den wesentlichen Strukturmerkmalen wie den Katalysemechanismen und den Substratspezifitäten. Zudem haben beide Enzyme ein ähnliches Molekulargewicht von 65 kDa bzw. 70 kDa. Die Unterschiede von COX-1 und COX-2 bestehen neben der Verteilung in den verschiedenen Gewebearten in Lokalisation der Gene auf ungleichen Chromosomen. Das COX-1 Gen befindet sich auf Chromosom 9q32-q33.3, umfasst ca. 22,5 kb und enthält 11 Exons. Die zugehörige COX-1 mRNA ist 2,8 kb lang. Das COX-2 Gen befindet sich auf Chromosom 1, ist 8 kb lang und beinhaltet nur 10 Exone. Die COX-2 mRNA ist mit 4 kb etwas länger als die ihres Isoenzym. [135-136, 149-150]. Verglichen mit der zwölfstündigen Lebenszeit der COX-1 mRNA besitzt die COX-2 mRNA eine begrenzte Lebenszeit von ungefähr drei Stunden. Aus diesem Grund handelt es sich beim COX-2 Gen um ein sogenanntes „*immediate-early*“ Gen [151]. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Isoenzymen ist die größere Promotorregion am 5' Ende des COX-2 Gens, da dem COX-1 Gen die TATA-Box in der Promotorregion fehlt [130]. Die TATA-Box dient als Startpunkt verschiedener Transkriptionsfaktoren, die die Geschwindigkeit von RNA-Polymerasen beeinflussen. Außerdem enthält die Promotorregion des COX-2 Gens eine Reihe von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B und *response element-binding protein*.

Die Induktion der COX-2 kann gewebeabhängig über verschiedene Signalwege erfolgen, die durch unterschiedliche Rezeptoren aktiviert werden. Zu den Induktoren der COX-2 zählen neben Wachstumsfaktoren wie beispielsweise EGF oder *insulin like growth factor II* auch Zytokine wie IL-1 β , IL-2, TGF- β und verschiedene Onkogene [152-155].

Zudem konnte in zahlreichen aktuellen Studien gezeigt werden, dass auch S1P in der Lage ist die COX-2 zu induzieren und die Induktion gewebeabhängig über verschiedene Signalwege durch unterschiedlich aktivierte S1PRs erfolgen kann [143, 156-157]. In den meisten Fällen verläuft die weitere Signaltransduktion über eine der bekanntesten Signalweg-Familien, nämlich über die MAPK-Familie. MAPKs sind eine Gruppe von Prolin-gesteuerten für Serin/Threonin spezifische Proteinkinasen, die überwiegend durch Wachstumsfaktoren, UV-Strahlung, inflammatorische Zytokine aber auch über GPCRs aktiviert werden können. Zu den drei Unterfamilien der MAPK-Signalwegfamilie zählt der p42/p44 MAPK- (auch ERK1/2 genannt), der p38 MAPK- und der *c-Jun N-terminal kinase / stress activated protein kinase* (JNK/SAPK)-Signalweg. Durch die MAPK werden Signale über verschiedene Kaskaden von der Zelloberfläche bis in den Zellkern weitergegeben. Jede Kaskade besteht aus drei Enzymen, die nacheinander phosphoryliert und anschließend aktiviert werden: MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK oder MEKK), MAP-Kinase-Kinase (MAPKK oder MEK) und MAP-Kinase (MAPK). Die funktionelle Bedeutung der MAPK ist vielfältig. So sind sie bei Prozessen der Proliferation und Differenzierung wie auch bei der Regulation von Entzündungsmediatoren beteiligt. Der ERK-Signalweg kann durch Rezeptortyrosinkinasen und GPCRs über die Aktivierung verschiedener Mitogene und Wachstumsfaktoren wie EGF stimuliert werden [158]. Zudem ist bekannt, dass die S1P-induzierte Aktivierung von ERK1/2 in Endothelzellen über G_i-Proteine und Ras erfolgt [159]. Die Regulation von ERK erfolgt anschließend durch RAF und MEK bis zu den ERK-MAP-Kinasen wobei am Ende verschiedene Proteine und Transkriptionsfaktoren wie c-Fos, Elk-1, Cyclin D1, p21, *cAMP response element-binding protein, activator protein 1* (AP-1) oder NF-κB aktiviert werden [160-162]. Dadurch ist die RAF/MEK/ERK-Kaskade bei der Regulation von Zellwachstum, Zellteilung, Zelldifferenzierung, Proliferation und bei Lernprozessen des zentralen Nervensystems beteiligt. Ein weiterer Signalweg aus der MAPK-Signalwegfamilie, über den die Induktion der COX-2-Expression erfolgen kann, ist der p38 MAPK-Signalweg, der durch UV-Strahlung, osmotischen Stress, proinflammatorische Zytokine und GPCRs aktiviert werden kann [163-164]. Diese Stimuli lösen verschiedene MAPKKK wie die TGF-β aktivierte Kinase 1 (TAK1) oder die *mixed-lineage kinase 3* (MLK3) aus. Andere MAPKKK wie *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) und MEKK4 können sowohl die p38- als auch die JNK-Kaskade aktivieren [165]. Wie schon bei der ERK-Kaskade, werden auch bei der p38-Kaskade Transkriptionsfaktoren wie CREB und ATF-1 sowie Proteine wie die

cPLA₂, Cyclin D1 und Bcl-2 aktiviert [166-168]. Der p38-MAPK Signaltransduktionsweg hat eine große Bedeutung bei der Regulation von Zellüberleben, Zelloptose, Zelldifferenzierung, Zellentwicklung sowie bei inflammatorischen Reaktionen. Ein weiterer wichtiger Signalweg aus der MAPK-Familie, der bei der Induktion der COX-2 berücksichtigt werden muss, ist der JNK-Signalweg. Dieser kann wie auch der p38 MAPK-Signalweg sowohl durch zellulären Stress, als auch durch UV-Strahlung, inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert werden [169-170]. Die weitere Aktivierung erfolgt durch etliche MAPKKK sowie in der nächsten Ebene durch MKK4 und MKK7. Ein Angriffspunkt der JNK ist die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun, das, gemeinsam mit c-Fos, als AP-1 die Genexpression reguliert und an Prozessen wie Zellproliferation, Zellüberleben, Zelloptose und Zelldifferenzierung beteiligt ist. AP-1 Bindesequenzen finden sich in den Promotorregionen verschiedener Gene. Auch in der Promotorregion von COX-2 gib es eine Bindestelle für AP-1 [171].

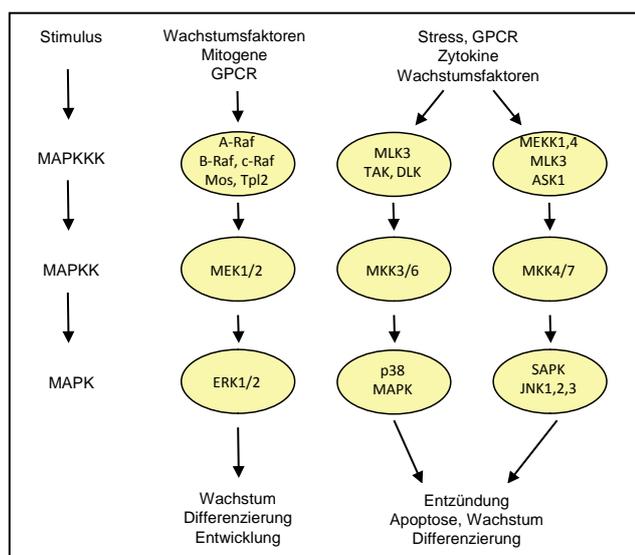


Abb. 10: Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade der Cyclooxygenase (COX)-Expression.

Die COX lässt sich durch verschiedene Stimuli induzieren. Die Signalweiterleitung verläuft in den meisten Fällen über die MAPK, die überwiegend durch Wachstumsfaktoren, UV-Strahlung, inflammatorische Zytokine aber auch über G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aktiviert werden können. Zu den drei Unterfamilien der durch COX aktivierten MAPK-Signalwegfamilie zählt der p42/p44 MAPK- (auch ERK1/2 *extracellular-signal regulated kinase 1/2* genannt), der p38 MAPK- und der *C-Jun N-terminal kinase / stress activated protein kinase* (JNK/SAPK)-Signalweg. Modifiziert nach (www.cellsignal.com/pathways/mapkinase.jsp).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Sphingolipide werden seit einigen Jahren in der wissenschaftlichen Literatur über ihre Funktion als reine Membranbestandteile hinaus zunehmend als bioaktive Signalmoleküle verstanden, die bei der Regulation elementarer Zellvorgänge unerlässlich sind. Eine Beeinflussung der Sphingolipid-metabolisierenden Enzyme sowie eine daraus resultierende Verschiebung des S1P-Metabolismus wird mit einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter Krebs, Arteriosklerose, Asthma, verschiedener rheumatischer und allergischer sowie neurodegenerativer Erkrankungen [172-173]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Wirkung verschiedener intra- und extrazellulärer Wirkmechanismen von S1P auf den Sphingolipid- und Eicosanoidmetabolismus in Mesangiumzellen untersucht werden um so neue Erkenntnisse für die zukünftige Behandlung von fibrotischen und entzündlichen Nierenerkrankungen zu liefern. Hierzu sollten zwei Teilaspekte näher untersucht werden:

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Beeinflussung des Sphingolipidstoffwechsels durch die PPAR γ -Agonisten TRO und RSG in primären glomerulären Mesangiumzellen untersucht, da dieser Zelltyp bei entzündlichen Nierenerkrankungen wie der GN eine zentrale Rolle spielt. PPARs entwickelten sich seit ihrer Entdeckung von einem weiteren Mitglied der Familie der nukleären Hormonrezeptoren zu einem wichtigen Target in der Arzneimittelforschung. PPAR γ ist einer von drei bekannten PPAR-Subtypen, der durch TZDs aktivierbar ist. Neben ihrer Funktion als Insulin-Sensitizer können TZDs auch anti-inflammatorisch und anti-fibrotisch im Hinblick auf die Entstehung und das Fortschreiten von chronischen, sowohl diabetisch als auch nicht-diabetisch induzierten Nierenerkrankungen und fibrotischen Prozessen wirken.

Ziel war es, zu untersuchen, ob PPAR γ -Agonisten in der Regulation der Expression von Enzymen des Sphingolipidstoffwechsels involviert sind um weitere Erklärungsansätze für die bekannten reno-protectiven Effekte, insbesondere die anti-fibrotische Wirkung von TZDs zu erhalten. Dazu wurde die Wirkung von TRO und RSG auf die Expression der SK-1 und CTGF untersucht. Des Weiteren wurde an Hand von Promoterstudien analysiert, ob die gemessene Expressionssteigerung der SK-1 durch TZDs auf einer Aktivierbarkeit des SK-1-Promoters beruht. Schließlich wurde die Expression der SK-1 nach der Verabreichung von TRO und RSG in Mäusen *in vivo* untersucht. Im Hinblick auf die Entstehung von Nierenerkrankungen sollte zudem der verantwortliche S1P-Rezeptorsubtyp in Rattenmesangiumzellen durch die Aktivierung von PPAR γ -Agonisten analysiert

werden. In diesem Zusammenhang konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass der S1P₁-Rezeptor und der S1P₂-Rezeptor attraktive Zielstrukturen zur Behandlung von DN oder Lupus-Nephritis darstellen [174-176]. Um weitere Erkenntnisse über den Wirkmechanismus von PPARs in Hinblick auf die Expression der S1P-Rezeptorsubtypen zu erhalten, wurde dafür die Wirkung von TRO und RSG auf das Expressionsverhalten der S1PRs untersucht. Darüber hinaus wurde durch Promoterstudien analysiert, ob die Regulation des S1P₁-Rezeptors durch TZDs auf einer Aktivierung funktioneller PPREs des S1P₁-Rezeptor-Promotors beruht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die funktionelle Rolle von extra- und intrazellulärem S1P auf die Expression und Aktivität der pro-inflammatorischen COX-2 in renalen Mesangiumzellen analysiert. Zudem wurden die Signalwege, die bei der S1P-vermittelten Expression von COX-2 beteiligt sind, untersucht. Dabei spielen vor allem die Signalwege der MAPK-Signalwegfamilie eine große Rolle. Zahlreiche Studien hatten gezeigt, dass die durch eS1P bewirkte Induktion der COX-2 gewebeabhängig über verschiedene S1PR-Subtypen und Signalwege verläuft. So hatten Nodai *et al.* 2007 gezeigt [143], dass in glatten Gefäßmuskelzellen, welche fast ausschließlich den S1P₂-Rezeptor und den S1P₃-Rezeptor exprimieren, die Induktion der COX-2-Expression über den S1P₃-Rezeptor vermittelt wird. In einer anderen Studie wurde veröffentlicht, dass die S1P-induzierte COX-2-Expression in Wilms-Tumorzellen über den S1P₂-Rezeptor verläuft [141]. Außerdem war bekannt, dass die S1P-induzierte COX-2-Expression in HeLa-Zellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien (HCASMC) über den ERK1/2-Signalweg verläuft [142, 177]. Auf der anderen Seite postulierte eine weitere Forschergruppe, dass in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte (rSMC) die Signalweiterleitung über eine von Ca²⁺-abhängige PKC und durch die Tyrosinkinase Src vermittelt wird und ERK1/2 keinen Einfluss hat [143]. Allerdings konnten in glomerulären Mesangiumzellen die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Signaltransduktion von S1P auf die COX-2-Expression und die aus diesen Beobachtungen resultierende pathophysiologische Relevanz noch nicht abschließend geklärt werden. Deshalb war es wichtig den verantwortlichen S1PR und dessen Signalweg für die Induktion der COX-2 in Mesangiumzellen zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Dazu wurde zunächst mit Hilfe der S1PR-Antagonisten JTE-013, VPC-23019 und W146 sowie mit siRNA gegen den S1P₂-Rezeptor der beteiligte S1PR identifiziert. Anschließend wurde durch die spezifischen MEK-Inhibitoren PD 98059 und U0126 und dem spezifischen p38 MAPK-Inhibitor SB 203580

der nachgeschaltete Signalweg des S1P₂-Rezeptors näher charakterisiert. Der intrazelluläre Wirkmechanismus von S1P auf die COX-2 wurde durch die pharmakologischen SK-1-Inhibitoren SKI II und N,N-dimethylsphingosine (DMS) untersucht um die Rolle der SK-1 in der Regulation des Eicosanoidmetabolismus zu prüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

ActD	Merck Biosciences, Schwalbach
Ang II	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DMS	Cayman Chemicals, Michigan, U.S.A.
GW-9662	Biomol, Hamburg
JTE-013	Cayman Chemicals, Michigan, U.S.A.
PD 98059	Merck Biosciences, Schwalbach
PTX	Merck Biosciences, Schwalbach
RSG	Cayman Chemicals, Michigan, U.S.A.
SB 203580	Merck Biosciences, Schwalbach
S1P	Biomol, Hamburg
SKI II	Merck, Darmstadt
TRO	Enzo Life Sciences, Lörrach
U0126	Merck Biosciences, Schwalbach
VPC-23019	Avanti Polar Lipids, Alabaster U.S.A
W146	Cayman Chemicals, Michigan, U.S.A.
Y 27632	Merck Biosciences, Schwalbach

Die weiterhin verwendeten folgenden Chemikalien und Lösungsmittel sind von:

- **Merck Biosciences, Schwalbach:** Chloroform, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Methanol (gradient grade für Chromatographie), Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Natriumhydroxid, Natriumphosphat-Dihydrat
- **Roth, Karlsruhe:** Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1), Agar, Agarose, Calciumchlorid, Essigsäure, Phenol, SDS, Trypton/Pepton aus Casein
- **Sigma Aldrich, Taufkirchen:** Ammoniumhydroxid, Ammoniumpersulfat, Ampicillin, Bovines Serumalbumin Fraktion V, Bromphenolblau, Cycloheximid, Diethylpyrocarbonat, DMSO, EDTA, EGTA, Ethidiumbromid, Glycerol, Hefeextrakt, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Manganchlorid, β -Mercaptoethanol, 4-Morpholinpropansulfonsäure, Natriumchlorid, Natriumcholat, Natriumcitrat, Natriumfluorid, Natriumpyrophosphat, N-Acetyl-L-Cystein, NP-40,

PMSF, Ponceau S, Propidiumiodid, Salzsäure, Tetramethylethyldiamin, Trichloressigsäure, Tris-HCl, Triton X-100, Tris-Base, Tween-20, Xylen 98 %

- **Invitrogen GmbH, Darmstadt:** Trizol

2.1.2 Zellkulturreagenzien

Bovines Serumalbumin, fettsäurefrei	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DMEM, 4,5 g/l D-Glukose, + GlutaMax™, -Pyruvat	Invitrogen GmbH, Darmstadt
DMEM/F-12 (1:1)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Dulbecco`s PBS, -Ca ²⁺ , -Mg ²⁺	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
HEPES, 1 M	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Insulin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumselenit-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Poly-L-Lysin hydrobromid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640, + GlutaMax™	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Transferrin	Roche Biochemicals, Mannheim
0,05 % Trypsin/EDTA	Invitrogen GmbH, Darmstadt

2.1.3 Zelllinien

rMC, B1	Isolierung der Primärzellen aus der Rattenniere wurde von Prof. Josef Pfeilschifter durchgeführt, Frankfurt/Main
mMC, WT und SK-1 ^{-/-}	Isolierung von Primärzellen aus der Mausnieren wurde von Dr. phil. nat. Lotte Hofmann durchgeführt, Frankfurt/Main
hMc	zur Verfügung gestellt von Prof. Heinfried Radeke, Frankfurt/Main
NRK	zur Verfügung gestellt von Prof. Liliana Schaefer, Frankfurt/Main

2.1.4 Medien

2.1.4.1 Nährmedien für Gewebekulturzellen

Wachstumsmedium (NRK)	500 ml DMEM/F-12 (1:1) 10 % FCS 5 ml Penicillin-Streptomycin
mMC-Wachstumsmedium	500 ml RPMI 15 % FCS 5 ml Penicillin-Streptomycin 10 mM HEPES 5 ng/ml Natriumselenit 5 µg/ml Transferrin 6 µg/ml Insulin 4,5 µM β-Mercaptoethanol
rMC-Wachstumsmedium	500 ml RPMI 10 % FCS 5 ml Penicillin-Streptomycin 10 mM HEPES 5 ng/ml Natriumselenit 5 µg/ml Transferrin 6 µg/ml Insulin
Hungermedium (NRK)	500 ml DMEM/F-12 (1:1) 0,1 mg/ml BSA/PBS (fettsäurefrei)
Hungermedium (rMC, hMC)	500 ml DMEM 0,1 mg/ml BSA/PBS (fettsäurefrei)
Hungermedium (mMC)	500 ml DMEM 0,1 mg/ml BSA/PBS (fettsäurefrei) 1 % FCS

2.1.4.2 Nährmedien für Bakterien

Der *E.coli* Stamm DH5 α wurde in LB (Lauria-Bertani)-Medium kultiviert. Zur Herstellung von Agar-Platten wurden 15 g/l Agar zugesetzt.

LB (Lauria-Bertani)-Medium	1 % Trypton/Pepton aus Casein
	0,5 % Hefeextrakt
	0,5 % NaCl (w/v)

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Erstantikörper

- Anti-Aktin
(Ziege, polyklonal; 1:3000, sc-1616) Santa Cruz, Heidelberg
- Anti-(humane)-SK-1
(Kaninchen, polyklonal; 1:1000)* Eurogentec, Seraing, Belgien
- Anti-(murine/ratten)-SK1
(Kaninchen, polyklonal; 1:1000)** Eurogentec, Seraing, Belgien
- Anti-COX-2
(Ziege, polyklonal; 1:1000, sc-1747) Santa Cruz, Heidelberg
- Anti-CTGF
(Ziege, polyklonal; 1:1000, sc-14939) Santa Cruz, Heidelberg
- Anti-phospho p44/p42 MAPK
(Maus, polyklonal; 1:1000, T202/Y204) Cell Signalling, Frankfurt
- Anti-p44/p42 MAPK (total-ERK)
(Kaninchen, polyklonal; 1:1000) Cell Signalling, Frankfurt
- Anti-PPAR γ
(Kaninchen, polyklonal; 1:1000, sc-7196) Santa Cruz, Heidelberg
- Anti-S1P₁-Rezeptor
(Kaninchen, polyklonal; 1:1000, #4809) ProSci Inc., Poway, U.S.A

*gegen zwei synthetische Peptide (CPSWKPPQQMPPPEEPL, CPRGGK GALQLFRSH), basierend auf der Sequenz der humanen Sphingosinkinase-1

**gegen zwei synthetische Peptide (CPSWKPPQQMPPPEEPL, CPRGGK GALQLFRSH), basierend auf der Sequenz der murinen Sphingosinkinase-1

2.1.5.2 Zweitantikörper

Anti-Ziege-IgG (Esel, HRP-gekoppelt; 1:3000, sc-2020)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Kaninchen-IgG (Esel, HRP-gekoppelt; 1:3000, NA934V)	GE Healthcare, München
Anti-Maus-IgG (Schaf, HRP-gekoppelt; 1:3000, NA931V)	GE Healthcare, München

2.1.6 Enzyme

Phusion [®] DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	QIAGEN Inc., Hilden
T4-DNA-Ligase	Promega GmbH, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.7 Plasmidvektoren

pGL3 basic Vektor	Promega GmbH, Mannheim
pBlueScript (pBS) Vektor	Life Technologies, Darmstadt
Renilla-Vektor	Promega GmbH, Mannheim

2.1.8 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α Genotyp: <i>F</i> ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rk-mk</i> ⁺), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, <i>thi-1</i> , Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>)	Stratagene, Heidelberg
--	------------------------

2.1.9 siRNA-Oligonukleotide

ON-TARGETplus S1pr2 (L-091187-01-0005)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
ON-TARGETplus Non-targeting siRNA (D-001810-01-05)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

2.1.10 Taqman[®]-Sonden

Alle verwendeten Taqman[®]-Sonden für die Real-Time-PCR-Analyse stammen von der Firma Applied Biosystems, Applied Biosystems, Weiterstadt.

Humane GAPDH 4310884E-1003044	Nr. 94404 (Kit)
Humane Sphingosinkinase-1	Hs00184211_m1
Humane Sphingosinkinase-2	Hs00219999_m1
Ratte COX-2	Rn00568225_m1
Ratte S1P ₁ -Rezeptor	Rn00568869_m1
Eukaryotische 18s rRNA	Nr. 4308329 (Kit)

2.1.11 Puffer und Lösungen

2.1.11.1 Puffer und Lösungen – RNA-Analyse

DEPC-Wasser	1 ml Diethylpyrocarbonat ad 1 l Milli-Q-Wasser über Nacht rühren, anschließend autoklavieren
75 %ige Ethanol-Lösung	75 ml Ethanol (puriss.) ad 100 ml DEPC-Wasser

2.1.11.2 Puffer und Lösungen – Protein-Analyse

Blockierungspuffer (Antikörperverdünnung)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 200 mM Natriumchlorid 2 % Triton-X 100 3 % BSA 10 % Pferdeserum
Milchpulverlösung (5 %)	5 g Magermilchpulver ad 100 ml PBST
Lysispuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 10 % Glycerin 1 % Triton-X 100 2 mM EDTA 2 mM EGTA 40 mM β -Glycerophosphat 50 mM Natriumfluorid 10 mM Natriumpyrophosphat 200 μ M Natriumorthovanadat 2 mM DTT 200 μ l Proteaseinhibitor-Cocktail- Stocklösung (Roche) per 5 ml Lysispuffer (kurz vor Anwendung dazugeben)
Lysepuffer A	10 mM HEPES (pH 7,9) 10 mM KCl 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF

Extraktionspuffer B	<p>20 mM HEPES (pH 7,9) 400 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 25 % Glycerol 0,5 mM PMSF 1 mM DTT</p>
Ponceau S-Lösung	<p>0,2 g Ponceau S 3 g Trichloressigsäure 100 ml VE (vollentsalztes)-Wasser</p>
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	<p>60,55 g Tris-Base 288,2 g Glycin 20 g Natriumdodecylsulfat (SDS) ad 2 l VE-Wasser</p>
SDS-Sammelgelpuffer	<p>30,28 g Tris-Base 10 ml 20 % SDS-Lösung ad 500 ml VE-Wasser mit konz. HCl auf pH 6.8 einstellen</p>
SDS-Trenngelpuffer	<p>90,85 g Tris-Base 10 ml 20 % SDS-Lösung ad 500 ml VE-Wasser mit konz. HCl auf pH 8.8 einstellen</p>
SDS-Denaturierungs- und Ladepuffer (4x)	<p>100 mM Tris-HCl (pH 7,4) 40 % Glycin 12,5 % SDS 5 % Bromphenolblau 20 % β-Mercaptoethanol</p>

Proteaseinhibitor-Cocktail	1 Tablette Complete [®] in 2 ml ddH ₂ O
Strippingpuffer	1 M Tris-HCl (pH 6,8) 10 % SDS 20 % β-Mercaptoethanol ad 100 ml VE-Wasser
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris-HCl (pH 7,4) 190 mM Glycin 10 % Methanol

2.1.11.3 Puffer und Lösungen – EMSA

TEN-Puffer	10 mM Tris-Base 1 mM EDTA 0,1 M NaCl mit konz. HCl auf pH 8,0 einstellen
10x TBE-Puffer	108 g Tris-Base 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA ad 1 l H ₂ O mit konz. HCl auf pH 8,0 einstellen
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer 0,3 % (v/v) Tween 20
<i>blocking stock</i>	10 g Blockingreagenz 100 ml Maleinsäurepuffer

Blockierungslösung	10 % (v/v) <i>blocking stock</i> in Maleinsäurepuffer
Antikörper-Lösung	1/10.000 Anti-DIG-AP 10 % (v/v) <i>blocking stock</i> in Maleinsäurepuffer
CSPD-Lösung	1:100-Verdünnung von CSPD-Reagenz

2.1.11.4 Puffer und Lösungen - Lipid-Analyse

Laufmittel Kinaseassay	1-Butanol: Ethanol: Essigsäure: Wasser (80:20:10:20, v/v)
Salzlösung (LC-MS/MS)	0,74 % (v/v) Kaliumchlorid 0,04 % (v/v) Calciumchlorid 0,034 % (v/v) Magnesiumchlorid in VE-Wasser
Sphingosinkinase-1-Puffer (Kinaseassay)	20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 20 % Glycerin 1 mM β -Mercaptoethanol 1 mM EDTA 1 mM Natriumorthovanadat 40 mM β -Glycerophosphat 15 mM Natriumfluorid 0,5 % Triton-X 100 frisch mit 1x Proteaseinhibitor-Cocktail versetzen
1 mM Substratlösung (Kinaseassay)	D- <i>erythro</i> -Sphingosin 4 mg/ml BSA in PBS

2.1.11.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS	8 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 0,24 g Kalium-dihydrogenphosphat 1,44 g Dinatrium-hydrogenphosphat ad 1 l VE-Wasser
PBST	8 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 0,24 g Kalium-dihydrogenphosphat 1,44 g Dinatrium-hydrogenphosphat 0,1 % (w/v) Tween-20 ad 1 l VE-Wasser
TAE (50x)	242 g Tris-Base 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 57,1 ml Essigsäure ad 1 l VE-Wasser

2.1.12 Kits / Assays / Transfektionsreagenzien

ABSOLUTE Blue QPCR Low ROX Mix	ABgene, Hamburg
Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V	Lonza, Köln
Bradford Protein Assay	Bio-Rad, München
DIG Gel Shift Kits, 2nd Generation	Roche Diagnostics, Mannheim
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN Inc., Hilden
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH
FuGENE® HD Transfection Reagent	Roche Biochemicals, Mannheim
Lipofectamine PLUS™ Reagent	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Nucleo Spin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren

peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PGE ₂ EIA Kit	Enzo Life Sciences GmbH, Lorrach
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm™ MP Röntgenfilm	GE Healthcare, München
DC-Alufolien (20 x 20 cm); Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
Hybond™-ECL™ Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München
Hybond™-N+ Nitrozellulosemembran	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Luminometer-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Massenspektrometrie-Röhrchen	Machery-Nagel GmbH, Düren
Whatman® Filterpapier (3MM)	Whatman International Ltd., Maidstone, GB

2.1.14 Geräte

ABI 4000 Q-Trap	Applied Biosystems, Weiterstadt
AutoLumat LB953	Berthold, Bad Wildbad
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Gel-Doc 1000	Bio-Rad, München
Hyperprocessor (Filmentwickler)	GE Healthcare, München
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Neustadt
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Pharos FX™ Plus Molecular Imager	Bio-Rad, München
Thermocycler	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler	Bio-Rad, München
TransBlot SD	Bio-Rad, München
UV-Transilluminator	Bio-Rad, München

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Verwendete Tiere

Es wurden 3 bis 4 Monate alte weibliche SK-1^{-/-}-Mäuse [39] verwendet und mit gleichaltrigen Wildtyp-Tieren C57BL/6NCrl als Kontrollen verglichen. C57BL/6NCrl-Kontrolltiere wurden von der Charles River GmbH, Sulzfeld bezogen. Hierbei handelt es sich um einen syngenen (genetisch identischen) immunkompetenten Mausstamm. Das Gewicht der Wildtyp-Tiere betrug $23,45 \pm 0,15$ g und das der SK-1^{-/-}-Mäuse betrug $22,67 \pm 0,47$ g (\pm SEM). Die Versuche wurden von Herr Dr. Alexander Koch (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Frankfurt) durchgeführt.

2.2.2 Haltung und Zucht der Mäuse

In der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) der medizinischen Universität der Johann-Wolfgang-Goethe Universität erfolgte die Haltung der oben genannten Mäuse entsprechend der in §9 des deutschen Tierschutzgesetzes vorgegebenen Tierhaltungs-Bestimmungen. Die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes wurden bei allen Tierversuchen eingehalten und zuvor ein entsprechender Antrag beim Regierungspräsidium des Landes Hessen in Darmstadt eingereicht.

2.2.2.1 Tierhaltung in offener Zucht

In durchsichtigen Polykarbonkäfigen des Eurostandard-Typs 3 mit einer Grundfläche von 820 cm^2 (42,5 x 26,0 x 15,5 cm) wurden je 5 Mäuse auf Hobelspänen gehalten. Mittels einer Zeitschaltuhr wurde der künstliche Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h mit jeweils 10 min Dämmerungsphase (6:01Uhr-18:00Uhr Tagphase und 18:01Uhr-6:00Uhr Nachtphase) gehalten.

Die einströmende Luft wurde mittels Staubfilter gereinigt, eine Klimaautomatik sorgte für konstante thermische Umweltbedingungen mit einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C sowie einer konstanten relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %.

Nach Standardbedingungen erfolgte die Futter- und Wasserzuteilung (Ratten-Mäusehaltung-Pellett V der Firma FFNIFF, Deutschland).

2.2.3 Tierversuch

Den Mäusen wurde entweder 15 mg/kg TRO, oder RSG, gelöst in DMSO: Sonnenblumenöl (1:15; v/v), oral über eine Schlundsonde verabreicht. Kontrolltieren wurden 200 µl DMSO/Sonnenblumenöl ebenfalls über eine Schlundsonde verabreicht, wobei jede Wildtypgruppe jeweils 8 Tiere und die SK-1^{-/-}-Gruppe jeweils 3 Tiere umfasste. Nach 24 h wurden die Nieren der Tiere entnommen und die Glomeruli nach der differenzierenden Sieb-Methode isoliert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C unter 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator der Firma Heraeus (BBD 6220) in einem entsprechenden Wachstumsmedium (siehe 2.1.4) inkubiert.

2.3.2 Subkultivierung von Zellen

Für die Subkultivierung der im Abschnitt 2.1.3 genannten Zellen wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (1,0 ml/T75-Flasche) behandelt, bis sie sich vom Kulturgefäßboden ablösten. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium resuspendiert, bei 800 Upm für 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend in frischem Wachstumsmedium in einer Verdünnung (1:2 bis 1:10) in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

2.3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen trypsiniert, abzentrifugiert (5 min, 800 Upm) und in Einfriermedium (Kulturmedium/FCS 1:1 mit 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Lagerung auf Eis wurde die Zellsuspension über Nacht bei -80 °C langsam in einer Styropor-Box heruntergekühlt, bevor sie in flüssigem

Stickstoff dauerhaft gelagert wurden. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, mit warmem Kulturmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen wie unter 2.3.1 angegeben kultiviert.

2.3.4 Stimulation von Zellen

Für die Experimente wurden die Zellen bis zur Konfluenz in Kulturschalen kultiviert. Nach einer 16 bis 48-stündigen Inkubation der Zellen in Hungermedium wurden die Zellen für die angegebene Zeitspanne mit den entsprechenden Substanzen stimuliert.

2.3.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für die Transfektion wurden 5×10^4 bis 5×10^5 Zellen/cm² einen Tag vor der Transfektion in Kulturmedium auf einer Kulturschale (Ø 35mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgelegt, so dass sie am nächsten Tag zu 50-80 % konfluent waren. Die Transfektionsreaktionen wurden jeweils gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde das FuGENE[®] HD Transfection Reagenz bzw. Lipofectamine Plus[™] Reagenz für die Transfektion der Promotorkonstrukte verwendet. Die Funktionalität der DNA-Konstrukte wurde mit Hilfe von Western-Blot-Analysen und PCR-Experimenten überprüft.

2.3.6 Elektroporation von eukaryotischen Zellen mit der Amaxa[™]-Methode

Bei der Elektroporation werden die zu transfizierenden Zellen in ein elektromagnetisches Feld eingebracht, wodurch sich Poren in der Zellmembran bilden, die sich nach dem Bruchteil einer Sekunde wieder schließen. Befinden sich in der Zellsuspension Nukleinsäuren wie siRNAs oder Plasmide, so können diese durch Poren in die Zellen aufgenommen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Elektroporation mit dem Amaxa[™]-System verwendet, um siRNA-Moleküle gegen den SIP₂-Rezeptor in rMc einzubringen.

Für die Nukleofektion der rMc wurde das „Cell Line Nucleofector Kit V“ und das Nukleofektionsprogramm A0-33 verwendet. 2×10^6 Zellen wurden auf 5 ml Medium in 15er Falcon (BD Biosciences) überführt und 5 Minuten bei 800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 100 μ l Amaxa-Lösung resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml großes Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden entweder ohne Zugabe einer Nukleinsäure (MOCK-Kontrolle) direkt oder nach Zugabe von 2,5 μ g siRNA transfiziert. Nach Zugabe der siRNA wurden die Proben in Amaxa-Küvetten überführt. Diese Küvetten besitzen seitliche Metallplatten, die einen Stromfluss durch deren Inhalt erlauben. Die Küvetten wurden einzeln in den Nukleofektor gestellt. Die Nukleofektion erfolgte mit dem Programm A0-33. Danach wurden die Proben in 500 μ l vorgewärmtes Vollmedium überführt, auf 3 Löcher einer 6-well Platte aufgeteilt und im Brutschrank für 48 h inkubiert.

2.4 Bakterienkultur

Der *E. coli* Bakterienstamm DH5 α wurde für die Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet. Hierfür wurden die Bakterien in LB (Lauria-Bertani)-Medium (1 % Trypton/Pepton aus Casein (w/v); 0,5 % Hefeextrakt (w/v); 0,5 % NaCl (w/v)) bei 37 °C kultiviert. Für die Vermehrung der Plasmid-tragenden Bakterien wurde dem Medium das entsprechende Resistenz-Antibiotikum zugesetzt (Ampicillin 100 μ g/ml oder Kanamycin 50 μ g/ml). Um einzelne Klone zu erhalten, wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen (LB-Medium; 1,5 % Agar (w/v)) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Langzeit-Konservierung der transformierten Bakterien (2.4.2) wurden diese mit 30 % sterilem Glycerol (v/v) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.1 Herstellung von kompetenten Bakterien

Der Begriff "Kompetenz" bezeichnet die Fähigkeit von Zellen, DNA aufnehmen, d.h. transformiert werden zu können. Zur Gewinnung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α wurden diese zunächst in 4 ml LB-Medium über Nacht vorkultiviert (2.4). Mit dieser Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium auf eine OD600 von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 135 rpm bis zu einer OD600 von 0,4 kultiviert. Die

Zellsuspension wurde anschließend für 10 min bei 4.000 x g und 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet in insgesamt 40 ml kaltem CaCl₂ (50 mM) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut für 10 min bei 4.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 5 ml kaltem CaCl₂ (50 mM) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 1,3 ml kaltem 87 %igem Glycerol aufgenommen und in Aliquots zu 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Transformation von Bakterien

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe des Hitzeschockverfahrens. Nach dem Auftauen auf Eis wurde zu 100 µl Zellen 1-2 µl Plasmid- DNA-Lösung bzw. 5 µl Ligationsansatz gegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C wurden die Zellen erneut für 5 min auf Eis inkubiert und zur Regeneration anschließend in 800 µl SOC-Medium für 1 h bei 37 °C und 180 Upm in einem Thermoschüttler (Eppendorf GmbH, Hamburg) inkubiert. Diese Kultur wurde bei 300 Upm in einer Tischzentrifuge (PICO 17 Centrifuge, Heraeus, Hanau) pelletiert, das Zellpellet im Rückfluss resuspendiert und auf einer Platte mit LB-Agar und entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNA-Techniken

2.5.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Geringe und große Mengen an Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) sowie des EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (QIAGEN Inc., Hilden) gewonnen. Zuvor wurden die Zellen in 4 bzw. 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Das Prinzip beruht auf einer alkalischen Lyse.

2.5.1.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch. Dazu wurde die OD der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines NanoDrop™ 1000 Spectrophotometers (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) gemessen.

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$K [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

V= Verdünnung; F= Faktor (50 für DNA)

Das Verhältnis von E260/280 liegt bei weitgehend proteinfreier DNA bei einem Wert von ca. 2,0. Davon abweichende Werte deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

2.5.1.3 DNA-Agarosegelelektrophorese

Für analytische Zwecke wie Größenauftrennung, Qualitäts- und Quantitätsbestimmungen von Nukleinsäuren wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,8-2 % (w/v) in 1x TAE-Puffer verwendet. Mit abnehmender Größe der DNA-Fragmente wurde eine steigende Agarosekonzentration gewählt. Nukleinsäurefragmente wurden durch die Zugabe von Ethidiumbromid (5 µg/ml) zur Agaroselösung angefärbt und auf einem UV-Transilluminator (Bio-Rad, München) mit einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht. Jede Probe wurde zuvor mit 0,2 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und als Referenz wurde zusätzlich ein DNA-Marker (1 kb-Molekulargewichtsmarker, MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Die Proben wurden mit einer Spannung von bis zu 10 V/cm Gellänge für ca. 30 min aufgetrennt und mit einem Bilddokumentationssystem (Gel-Doc 1000; Bio-Rad, München) fotografiert.

2.5.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Reinigung und Konzentrierung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Reaktionen wurde das NucleoSpin® Extract Kit (Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt. DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator (Bio-Rad, München) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers extrahiert.

2.5.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der PCR wurden DNA-Fragmente spezifischer Länge und Sequenz *in vitro* amplifiziert. Hierzu wurden jeweils zwei Oligonukleotide (*Primer, forward* und *reverse*) verwendet, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Ein wiederholter Zyklus aus DNA-Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung und *Primer*-Verlängerung über eine hitzestabile DNA-Polymerase ermöglichte die Synthese des gewünschten DNA-Fragments. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und in H₂O *bidest* auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt (Tabelle 6, Anhang 7).

Routine-Amplifikationen von kleineren DNA-Fragmenten, die vor allem der Kontrolle von Klonierungen dienten, wurden mit der *Taq*-DNA-Polymerase (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Größere DNA-Fragmente, insbesondere vollständige Gene, wurden mit der *Phusion*® DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) amplifiziert, die eine zusätzliche *proofreading*-Aktivität besitzt. Als DNA-Matrize diente chromosomale DNA aus der Ratte (Rat Genomic DNA, Novagen, Darmstadt) oder Plasmid DNA.

Ein 20 μl PCR-Ansatz für Amplifikationen mit der *Taq*-DNA-Polymerase setzte sich wie folgt zusammen:

2 μl 10x PCR-Puffer

100 ng DNA-Lösung als Matrize, chromosomale DNA oder Plasmid-DNA

0,5 μM *Primer forward*

0,5 μM *Primer reverse*

0,2 mM dNTP-Mix

0,2 μl *Taq*-DNA-Polymerase

add to 20 μl with H₂O *bidest*

Die PCR-Bedingungen für DNA-Fragmente mit der *Taq*-DNA-Polymerase wurden in der Regel folgendermaßen gewählt:

Initiale Denaturierung:	95 °C für 1 min	} 25-35 Zyklen
Denaturierung:	95 °C für 30 sec	
Annealing:	T _m - 5 °C für 3 min	
Elongation:	72 °C für 1 min/kb	

Terminale Elongation: 72 °C für 10 min
 Stopp: 4 °C ∞

Ein 50 µl PCR-Ansatz für Amplifikationen mit der *Phusion*® DNA-Polymerase setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl 5x *Phusion* DNA-Polymerase-Puffer

100 ng DNA-Lösung als Matrize, chromosomale DNA oder Plasmid-DNA

0,5 µM *Primer forward*

0,5 µM *Primer reverse*

0,2 mM dNTP-Mix

0,5 µl *Phusion* DNA-Polymerase

add to 50 µl with H₂O *bidest*

Die PCR-Bedingungen für DNA-Fragmente mit der *Phusion*® DNA-Polymerase wurden in der Regel folgendermaßen gewählt:

Initiale Denaturierung:	98 °C für 30 sec	
Denaturierung:	98 °C für 10 sec	} 25-35 Zyklen
Annealing:	T _m + 3 °C für 15 sec	
Elongation:	72 °C für 30 sec/kb	
Terminale Elongation:	72 °C für 10 min	
Stopp:	4 °C ∞	

Die Reaktionen wurden in den Thermocyclern (Applied Biosystems Applera, Weiterstad oder Bio-Rad, München) durchgeführt.

Zur Analyse der Größe sowie zur Reinigung der amplifizierten Fragmente wurden die PCR-Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen (2.5.1.3) und gereinigt (2.5.1.4).

2.5.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von PCR-Produkten umfasste die Schritte der Restriktion des Zielvektors sowie der PCR-Produkte (2.5.2.1), der Ligation der PCR-Produkte mit dem Zielvektor (2.5.2.2), der Transformation der entstandenen Plasmide in Bakterienzellen durch Hitzeschock (2.4.2) und deren anschließende Vermehrung (2.4). Die erfolgreich transformierten Zellen wurden über ein im Vektorsystem integriertes Selektionssystem identifiziert und selektiv vermehrt, woraufhin die gesuchten DNA-Fragmente isoliert werden konnten (2.5.1.1).

2.5.2.1 DNA-Restriktion

Voraussetzung für das Klonieren verschiedener DNA-Fragmente in Vektoren sind kompatible Ligationsstellen. Hierzu wurden die Vektoren pGL3 basic (Promega) und pBlueScript (Life Technologies) an ihrer *multiple cloning site* mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* (10 U/ μ l) und *XhoI* (10 U/ μ l) geschnitten, ebenso wie die Enden der DNA-Fragmente. Für die Durchführung wurden Fast Digest® Enzyme der Firma Fermentas (Fermentas, St. Leon-Rot) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verwendet. Für einen 20 μ l Plasmidrestriktionsansatz wurden 1-3 μ g Plasmid-DNA, 1x Fast Digest®-Puffer, 1 μ l CIP (*caly intestine phosphatase*, Roche, Penzberg), je 1 μ l Restriktionsenzym und H₂O *bidest* zusammengegeben. Die Phosphatase CIP verhinderte durch Dephosphorylierung der 5'-Enden eine Religation der geschnittenen Vektoren. Für das Schneiden von DNA-Fragmenten wurden 20 μ l PCR-Produkt mit je 0,5 μ l Restriktionsenzym, 1x Fast Digest® Puffer und H₂O *bidest* versetzt. Für Kontrollrestriktionen genügten 300-500 ng Plasmid-DNA. Die Ansätze wurden 1 h bei 37 °C inkubiert, mit einer anschließenden Hitzeinaktivierung der Enzyme für 20 min bei 65 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Restriktionen bei 4°C gelagert. Zur Reinigung der DNA von Enzymen und Puffern wurde eine Gelelektrophorese mit anschließender Extraktion der DNA aus dem Agarosegel nach Punkt 2.5.1.4 durchgeführt.

2.5.2.2 Ligation

Ligationen von geschnittenen, gereinigten Vektoren und DNA-Fragmenten wurden mittels der T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Hierzu wurde ein 20 µl Ligationsansatz bestehend aus 100-200 ng Plasmid-DNA, der fünffachen Menge an DNA-Fragment, 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) und H₂O *bideest* für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Die anschließende Transformation des Ligationsansatzes in Bakterien erfolgte dann wie unter 2.4.2 beschrieben.

2.5.2.3 Sequenzierung von Plasmidvektoren und PCR-Produkten

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach einer Variation der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Als DNA-Matrize diente entweder ein PCR-Produkt, das auf einem Agarosegel eine einzelne Bande zeigte, oder aber Plasmidkonstrukte in den bereits genannten Vektoren. Die Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen, sowie die Gewinnung reiner Plasmid-DNA wurden wie unter 2.5.1.3 und 2.5.1.4 durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion wurden 600-700 ng DNA in einem Reaktionsvolumen von 7 µl mit 20 pmol Primer vermengt.

Die Sequenzierung wurde von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen durchgeführt.

2.5.3 Bestimmung der Promotoraktivität

Zur Messung der Promotoraktivität wurde das Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System verwendet. Dazu wurden die jeweiligen Promotorfragmente in einem pGL3-Vektor als auch der Renilla-Kontrollvektor, wie im Abschnitt 2.3.5 beschrieben, in NRK Zellen mit dem FuGENE[®] HD Transfection Reagenz (Roche, Mannheim) bzw. Lipofectamine Plus[™] Reagenz (Invitrogen GmbH, Darmstadt) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 16-20 h mit dem genannten Stimulus inkubiert, das Stimulationsmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem „*Passive Lysis Buffer*“ von Promega nach Herstellerangaben lysiert. Von diesem Lysat wurden jeweils 40 µl in entsprechende Luminometer-Röhrchen überführt und die Lichtemission in einem Luminometer

(Autolumat LB 953; Berthold, Bad Wildbad) gemessen. Die gewonnenen Daten für die Firefly-Luciferase und die Renilla-Luciferase wurden gegeneinander abgeglichen, um die Promotoraktivität als relativen Luciferasewert (RLU) zu bestimmen.

2.5.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Zum Nachweis der Bindung von Proteinen an DNA diente der EMSA. Dabei wurde ein Digoxigenin (DIG)-markiertes DNA-Fragment, welches eine PPRE-Bindesequenz enthielt, mit gereinigtem Kernprotein inkubiert und anschließend auf ein nicht denaturierendes 6%iges Tris-Borat-EDTA (TBE)-Gel aufgetragen. Bei einer Bindung des Proteins an die DNA wurde diese in ihrem Gellauf verlangsamt. Die Durchführung erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (DIG Gel Shift Kits, 2nd Generation, Roche Diagnostics, Mannheim).

2.5.4.1 Herstellung eines DIG-markierten DNA-Fragments

Der Bereich der Promotorregion des zu untersuchenden Gens wurde wie unter 2.5.3 beschrieben durchgeführt. Das in der Promotorregion zu untersuchende DNA-Fragment (PPRE) wurde mit Hilfe des DIG Gel Shift Kits, 2nd Generation (Roche Diagnostics, Mannheim) mit Digoxigenin (DIG) markiert. Hierzu wurden zunächst zueinander komplementäre Oligonukleotide mit dem entsprechenden PPRE 1:1 mit TEN-Puffer versetzt und zum Lösen von Sekundärstrukturen für 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf 15-25 °C wurde die Probe kurz abzentrifugiert und folgender Ansatz zusammengegeben (ab diesem Schritt wurde die Probe bei 4 °C weiterbehandelt):

10 µl des verdünnten DNA-Fragments

4 µl DIG-*labelling*-Puffer

4 µl Kobalt-Dichlorid

1 µl DIG-ddUTP-Lösung

1 µl Terminale Transferase

Alle Reagenzien entstammten dem DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation (Roche Diagnostics, Mannheim). Der Ansatz wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert, wobei die Terminale

Transferase DIG-markierte ddUTP-Moleküle an das 3'-Ende des DNA-Fragments anknüpfte. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung (pH 8,0) zugegeben und die Probe mit H₂O *bideest* auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt. Zum Test der Funktionalität der entstandenen DNA-Sonde wurde diese in verschiedenen Verdünnungen in TEN-Puffer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Pharmcia Biotech, Buckinghamshire, GB) pipettiert. Die Effizienz der DIG-Markierung wurde überprüft, indem die Signalstärken (Detektion 2.5.4.4) mit einer im Kit vorhandenen Kontroll-DNA (Kontroll-Oligonukleotid, doppelsträngig, 39-mer, unmarkiert, Roche Diagnostics, Mannheim) verglichen wurden. Die Konzentration sollte bei 4 ng/µl liegen.

2.5.4.2 Experimenteller Ansatz und Gelelektrophorese

Für die *Electrophoretic Mobility Shift*-Reaktion wurde das markierte DNA-Fragment 1:10-1:2000 in TEN-Puffer verdünnt. Als Proteinprobe wurden Kernproteine aus NRK-Zellen (2.7.1.2) eingesetzt.

Ein 10 µl-Ansatz mit dem DIG Gel Shift Kit setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl 5x Bindepuffer

1 µl Lösung des DIG-markierten DNA-Fragments (0,4 ng/µl)

0,5 µl Poly-Lysin

1 µl *competitor*-DNA Poly [d-IC]

5 µg Protein

H₂O *bideest* ad 10 µl

Alle Reagenzien entstammten dem DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation (Roche Diagnostics, Mannheim). Die Proben wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich die DNA-Protein-Komplexe ausbilden konnten. Für die Elektrophorese wurden 6%-ige Tris-Borat-EDTA Gele verwendet. Als Laufpuffer kam 0,5x TBE-Puffer zum Einsatz. Vor dem Auftragen wurde den Ansätzen je 2,5 µl Gelladepuffer mit Bromphenolblau (Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben. Die Proben wurden auf das nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gel aufgetragen und bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt bis der Bromphenolblau-Marker den unteren Gelrand erreicht hatte.

Tabelle 2: Zusammensetzung TBE-Gel

TBE-Gel	
	6 %
10x TBE-Puffer	0,6 ml
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37.5:1)	2,4 ml
dH ₂ O	9 ml
Ammoniumpersulfat 10 %	130 µl
TEMED	10 µl

2.5.4.3 DNA-Transfer und Bindung

Für den Transfer der DNA wurde eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB), die vor Gebrauch zum Equilibrieren in 0,5x TBE-Puffer getränkt wurde, auf einen Stapel aus vier in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in 0,5x TBE-Puffer getränkten 3MM-Whatman-Papiere in eine Blotapparatur (TransBlot SD, BioRad) gelegt. Auf die Membran wurde luftblasenfrei das DNA-Proteingel gegeben. Ein weiterer Stapel aus vier in 0,5x TBE-Puffer getränkten 3MM-Whatman-Papiere wurde auf das Gel gelegt und der Transfer der DNA auf die Membran nach Angaben des Herstellers für 1 h bei 300 mA und 30 V durchgeführt.

Durch UV-Bestrahlung im UV-Stratalinker® 1800 (Stratagene, Heidelberg) wurden die DNA Proben nach zweimaligem Autocrosslink mit 120.000 µJ auf der Membran fixiert.

2.5.4.4 Detektionsreaktion

Die Blockierung der Membran erfolgte für 30 min in 1x Blockierungslösung (Roche Diagnostics, Mannheim). Anschließend wurde der Blockierungslösung Anti-DIG-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10000 zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubationszeit folgten zum Entfernen nicht gebundener Antikörper drei Waschgänge in Waschpuffer für jeweils 15 min. Zur Detektion wurde die Membran zunächst für 1 min in Detektionspuffer equilibriert und anschließend mit CSPD-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim) benetzt und in Klarsichtfolie in eine Filmkassette gelegt. Nachdem die Membran für 15 min bei 37 °C inkubiert worden war, erfolgte die Detektion der Signale auf Röntgenfilmen

(Hyperfilm™ MP, GE Healthcare, München). Der belichtete Röntgenfilm wurde in einer Entwicklermaschine (Hyperprocessor, GE Healthcare) entwickelt.

2.5.5 RNA-Techniken

2.5.5.1 RNA-Isolierung

Mit Hilfe des Trizol®-Reagenz (Sigma Aldrich, Taufkirchen) wurde die Gesamt-RNA aus den verschiedenen Zelllinien nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Dafür wurde für eine Ø 60 mm-Schale (Greiner Bio-One, Frickenhausen) 1 ml Trizol®-Reagenz verwendet. Nach Entsalzen des RNA-Präzipitats in Isopropanol und anschließendem Waschen in 75 %iger Ethanol-Lösung (in DEPC-H₂O) wurde dieses für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Menge in 20-80 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Bevor die Gesamtmenge der isolierten RNA bestimmt werden konnte, wurden die Proben zur vollständigen Lösung für weitere 10 min bei 55 °C in einem Thermoschüttler inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.5.5.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch. Dazu wurde die OD der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer gemessen.

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$K [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

V= Verdünnung; F= Faktor (40 für RNA)

Das Verhältnis von E260/280 liegt bei weitgehend proteinfreier RNA bei einem Wert von ca. 2,0. Davon abweichende Werte deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin.

2.5.5.3 Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-PCR)

Bei der Reversen-Transkriptase-Reaktion wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden Gen-unpezifische Random Hexamer Primer bzw. Oligo-dT-Primer verwendet. Diese und die unter Punkt 2.5.5.4 beschriebene Methode wurde von Herr Dr. Alexander Koch (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Frankfurt) durchgeführt.

Es wurde folgender Ansatz für die Reverse Transkriptase Reaktion verwendet:

1 µg	Gesamt-RNA
1 µl	Random Hexamer Primer (Analyse von 18s rRNA)
	Oligo-dT-Primer (Analyse von GAPDH rRNA)
ad 12 µl	DEPC-H ₂ O

Der erste Schritt der RT-Reaktion, der zur Anlagerung der Random Hexamer Primer an die RNA führte, wurde für 5 min bei 70 °C durchgeführt und durch den Transfer der Proben auf Eis gestoppt. Danach wurden der Reaktion

4 µl	5x Reaktionspuffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
1 µl	RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20 U/µl)
2 µl	10 mM dNTP Mix [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]
1 µl	RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase

zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit der Pipette gemischt. Der Ansatz wurde nach Herstellerangaben inkubiert und dann 1:5 auf ein Volumen von 100 µl mit DEPC-H₂O verdünnt.

2.5.5.4 Real-Time-PCR (Taqman®)

Die Ansätze wurden in Duplikaten pipettiert und sämtliche Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Für die Analyse wurde jeweils 1 µg RNA mit Hilfe von Random Hexamer-*Primern* bzw. Oligo-dT-*Primern* in cDNA umgeschrieben (2.5.5.3).

Folgendes Pipettierschema wurde für die Analysen verwendet:

Tabelle 3: Pipettierschema für die Real-Time-PCR

18s / GAPDH rRNA		untersuchtes Gen	
1 µl	cDNA	5 µl	cDNA
je 0,1 µl	<i>Primer</i>	1 µl	genspezifische Sonde (FAM-markiert) inklusive <i>Primer</i>
0,1 µl	Sonde (VIC-markiert)	--	--
10 µl	PCR-Mix (ABgene)	10 µl	PCR-Mix (ABgene)
8,7 µl	DEPC-Wasser	4 µl	DEPC-Wasser

Die Proben wurden sorgfältig gemischt und anschließend auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Der PCR-Lauf erfolgte in einem „7700 HT Sequence Detection System“ der Firma Applied Biosystems.

Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet:

50 °C 5 sec
 94 °C 15 min
 94 °C 15 sec
 60 °C 60 sec

Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Um die relative Expressionsregulation zu erhalten, wurde der CT-Wert (*threshold cycle*) des zu untersuchenden Gens mit dem CT-Wert eines durch die verwendete Stimulation nicht regulierten Gens (18s rRNA/GAPDH rRNA) verrechnet und danach mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Relative Expression: } 2^{-(\Delta C_T - \Delta C_T)}_T$$

ΔC_T : Differenz der CT-Werte von reguliertem und unreguliertem Gen

$\Delta C_T - \Delta C_T$: Differenz zwischen den regulierten Proben $\Delta C_T(\Delta C_T)$ und der Kontrolle $\Delta C_T(\Delta C_T)$

Die Versuche wurden von Herr Dr. Alexander Koch (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Frankfurt) durchgeführt.

2.6 Bestimmung zellulärer Parameter

2.6.1 Sphingosinkinase-Aktivitätsassay

Um die Aktivität der SK zu bestimmen, wurden die Zellen, wie in 2.3.4 beschrieben, mit einem Stimulus für einen entsprechenden Zeitraum behandelt. Nach anschließendem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 200 μ l Lysispuffer (pro \emptyset 60 mm Kulturschale) lysiert. Im Anschluss daran wurden die Zellysate, wie unter 2.7.1 beschrieben, aufgearbeitet. 30-50 μ g Protein wurden in einem Endvolumen von 180 μ l Sphingosinkinasepuffer aufgenommen und zusammen mit 10 μ l 1 mM Sphingosin (in PBS mit 4 mg/ml BSA), 200 mM $MgCl_2$ und 0,1 μ l γ -[^{32}P] ATP (γ -[^{32}P] ATP (9,25 MBq, 250 μ Ci/ml) Perkin Elmer, Mechelen) pipettiert und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Für die Aktivitätsmessung der SK-1 wurde dem Sphingosinkinasepuffer 0,5 % Triton-X 100 beigesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l 1 N HCl gestoppt. Anschließend wurden 800 μ l einer Chloroform :Methanol :Salzsäure-Mischung (100 :200 :1, v/v), je 240 μ l Chloroform und 240 μ l 2 M KCl zugegeben, gut gevortext und 5 min bei 13'000 Upm zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen und 50 μ l der unteren Phase auf eine Dünnschicht-Chromatographie-Platte aufgetragen und für 4 h mit einem Laufmittelgemisch aus 1 Butanol :Ethanol :Essigsäure :Wasser (80 :20 :10 :20, v/v) aufgetrennt. Die Quantifizierung des radioaktiven S1P (welches der Aktivität der SK entspricht) erfolgte am darauffolgenden Tag mit einem Imaging-System der Firma Fuji (Raytest, Straubenhardt).

2.6.2 Quantitative Ceramid-, Sphingosin- und Sphingosin-1-Phosphat-Bestimmung mittels Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Zur quantitativen Bestimmung der Ceramid-, Sphingosin- und S1P-Spiegel der Zellen wurde eine Lipidextraktion durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten kultiviert, dann für 16 h in Hungermedium inkubiert und anschließend, wie unter 2.3.4 beschrieben, stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml Methanol, der einen internen Standard von C17-Ceramid (5 ng/ml), C17-Sphingosin (20 ng/ml) und C17-S1P (20 ng/ml) sowie 35 µl HCl (1 M) enthielt für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die mit einem Zellschaber abgelösten Zellen wurden daraufhin in ein mit Methanol gereinigtes Reagenzglas überführt, die einzelnen Wells der 6-Well-Platte erneut mit 1,2 ml Methanol gespült und mit der Methanollösung im Reagenzglas vereinigt. Zu dieser Mischung wurden 1,6 ml Salzlösung sowie 2 ml Chloroform gegeben, durch Vortexen gemischt und anschließend die untere Phase in ein Zentrifugenröhrchen (zuvor ebenfalls mit Methanol gereinigt) überführt. Es folgte ein zweiter und dritter Extraktionsschritt nach erneuter Zugabe von 2 ml bzw. 1 ml Chloroform. Die kombinierten Chloroform-Phasen im Zentrifugenglas wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge eingedampft, in 200 µl DMSO mit 2 % (v/v) HCl gelöst, unlösliche Partikel durch eine kurze Zentrifugation abgetrennt und die Proben abschließend in Massenspektrometrie-Röhrchen (Machery-Nagel GmbH, Düren) überführt. Die Messung erfolgte in einem Tandem-Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (ABI 4000 Q-Trap). Zur Auswertung wurde das zugehörige Programmpaket der Firma Applied Biosystems verwendet.

2.6.3 Präparation und Fixierung von Gewebeschnitten

Die histologisch zu verwendenden Nieren aus WT-Mäusen wurden für 24 h in 4 % Paraformaldehyd fixiert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet, um das Gewebe haltbar und schneidfest zu machen. Dazu wurden die Organe zuerst für 3 h in 50 % Ethanol eingelegt. Dieser Schritt wurde mit 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Ethanol und Isopropanol wiederholt. Daraufhin kamen die Nieren in Intermedium, ein Gemisch aus Isopropanol und Paraffin im Verhältnis 1:1 bevor

sie jeweils für 24 h in Paraffin 1 (46 °C - 48 °C) und Paraffin 2 (56 °C - 58 °C) gesetzt wurden. Schließlich wurden die Nieren in Silikon-Kautschuk-Förmchen eingebettet. Die Paraffin-Blöcke wurden über Nacht bei Raumtemperatur ausgehärtet. Nach deren Abkühlung wurden die eingebetteten Nieren mit dem Mikrotom (Leica, RM2125RT) in 3 µm dicke Schichten geschnitten, mit einem Pinsel aufgenommen und auf die Oberfläche eines Obekträgers aufgelegt (Thermo Scientific, Super Frost/Plus Obekträger). Vor dem Färben wurden die Schnitte mit Hilfe einer Wärmeplatte für einige Stunden getrocknet, um eine bessere Haftung zu erreichen.

2.6.4 PAS-Färbung von Gewebeschnitten

Um die Schnitte färben zu können, wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert und rehydriert. Dazu wurden die Objektträger mit den Schnitten zweimal 15 min lang in Xylol und anschließend für zweimal 5 Minuten in absoluten Ethanol gegeben. Dann wurden sie für jeweils 5 min in 96 % Ethanol, 70 % Ethanol und 50 % Ethanol rehydriert und in Wasser gewaschen. Bei diesem Prozess wurde das Paraffin nach und nach aufgelöst und nur das eingebettete Organ blieb zurück.

Für die PAS (*Periodic Acid Schiff*)-Färbung wurden die gespülten Objektträger mit den Nierenschnitten für 10 bis 15 min in Periodsäure (0,7 % in 70 % Ethanol) gestellt, dann zweimal in Wasser gespült und mit Schiffs-Reagenz gefärbt bis die Glomeruli in den Präparaten deutlich pink erschienen. Dann wurden die Objektträger unter fließendem, kaltem Leitungswasser gespült und mit Hämalaun (Kernfärbung) über einen Zeitraum von einer Minute gegengefärbt. Die Präparate wurden anschließend in warmem Wasser gespült und über Nacht luftgetrocknet.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Herstellung von Proteinextrakten

2.7.1.1 Gesamtzellextrakte

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben kultiviert. Nach der Stimulation wurden diese vor der Zellyse mit PBS (4 °C) gewaschen, durch Ablösen mit einem Zellschaber in Lysispuffer (100 µl / Ø 60 mm-Schale) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Lysate durch Sonifizieren mit dem Ultraschallstab (Branson Sonifier W-450) aufgeschlossen. Bei der darauffolgenden Zentrifugation von 10 min bei 13'000 Upm und 4 °C wurden alle Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand enthält die Proteinfraction und wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt, wie im Abschnitt 2.7.2 beschrieben, bestimmt. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.7.1.2 Kernextrakte

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben kultiviert. Nach der Stimulation wurden diese nach Abnehmen des Kulturmediums mit PBS (4 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl eiskaltem hypotonen Lysepuffer A (10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT und 0,5 mM PMSF) mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch die Zugabe von 0,1 % Nonidet P-40 lysiert. Die Zellen wurden anschließend für 1 min bei 4 °C und 13'000 Upm pelletiert. Das erhaltene Kernpellet wurde in 60 µl eines hochkonzentrierten Extraktionspuffers B (20 mM HEPES (pH 7,9), 400 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 25 % (v/v) Glycerol, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT) resuspendiert und unter Schütteln bei 4 °C für 20 min inkubiert. Der Nuklearextrakt wurde dann für 20 min bei 4 °C und 13'000 Upm zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford Protein Assay-Reagenz (BioRad, München) bestimmt.

2.7.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinmenge in zellulären Lysaten wurde mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt. Für die Standardkurve wurde zunächst ein BSA-Standard (1 mg/ml Stammlösung) in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 bis 30 µg BSA in 800 µl ddH₂O vorgelegt. 2-20 µl der Proteinextrakte (2.7.1) wurden jeweils mit H₂O auf 800 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl Bradford Protein Assay-Reagenz (BioRad, München) wurden die Proben kräftig gemischt und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die OD wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Mikroplatten-Lesegerät (Tecan, Neustadt) gemessen. Aus den Absorptionswerten wurde anschließend mit Hilfe der Software „Magellan3“ (Tecan, Neustadt) der Proteingehalt der Proben berechnet.

2.7.3 Trichloressigsäure (TCA)-Präzipitation von Proteinen aus Zellüberständen

Zur Fällung von Proteinen aus Zellüberständen wurde dieser zunächst für 10 min bei 13'000 Upm und 4 °C zentrifugiert, um abgeschwommene Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der zellfreie Überstand mit einer 70 %igen Trichloressigsäure-Lösung versetzt. Dieses Gemisch wurde 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13'000 Upm und 4 °C. Das Pellet wurde in 20 µl Tris/HCl (pH 8,5) sowie 20 µl 2x SDS aufgenommen und durch Vortexen gelöst. Es folgte ein Denaturierungsschritt von 7 min bei 95 °C. Danach wurden die Proben abzentrifugiert und auf ein SDS-Gel geladen und wie unter 2.7.5 und 2.7.6 beschrieben, weiter behandelt.

2.7.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen wurde in einem ersten Schritt die eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 20-50 µg Protein mit einer entsprechenden Menge 4x SDS-Ladepuffer versetzt und die Proben 10 min bei 95 °C denaturiert. 8 µl eines Molekulargewichtsmarker (PeqGold Protein-MarkerII, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) wurden in die äußerste Geltasche eines 1,5 mm dicken Tris-Glycin-Minigels aufgetragen. Für die Analyse der Sphingosinkinasen, der COX-2, des S1P₁-Rezeptors

sowie des CTGF wurden 10 %ige Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 80 V gestartet und sobald die Proteinproben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Im Anschluss daran erfolgte der Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, wie im nächsten Kapitel beschrieben wird.

Tabelle 4: Zusammensetzung der SDS-Gele

Trenngel		Sammelgel	
	10 %		
SDS-Trenngelpuffer	5 ml	SDS-Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37.5:1)	6,7 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37.5:1)	1,3 ml
dH ₂ O	8 ml	dH ₂ O	6 ml
SDS 10 %	200 µl	SDS 10 %	100 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	200 µl	Ammoniumpersulfat 10 %	60 µl
TEMED	10 µl	TEMED	20 µl

2.7.5 Elektrotransfer

Zur Detektion von spezifischen Proteinen wurde ein Nachweis mit Antikörpern durchgeführt. Der Transfer der Proteine aus Lysaten erfolgte nach der Methode des „Semi-Dry Blot“. Dafür wurde eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porengröße, BioRad) und sechs 3MM-Whatman-Papiere auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Sowohl die 3MM-Whatman-Papiere als auch die Membran wurden in Transferpuffer getränkt. Der Blot selbst wurde wie folgt aufgebaut: Anode - drei 3MM-Whatman-Papiere, die Nitrozellulosemembran, das Trenngel, drei 3MM-Whatman-Papiere - Kathode. Nach Auflegen der Elektroden erfolgte der Elektrotransfer in einer Blotapparatur (TransBlot SD, BioRad) für 1 h bei 100 mA pro Gel. Nach dem Transfer wurden die Membranen in Wasser gespült und in Ponceau S-Lösung (2 g/l) 2 min gefärbt, um die Gleichmäßigkeit des Blotvorgangs zu überprüfen. Danach wurden die Membranen mit PBST wieder entfärbt. Anschließend folgte der immunochemische Nachweis der Proteine wie im nächsten Abschnitt beschrieben.

Der Transfer von Proteinen aus Überständen erfolgte nach der Methode des „Wet Blot“. Der Aufbau entsprach dem des „Semi-Dry Blot“, wobei der Transfer für 1 h bei 80 V vorgenommen wurde.

2.7.6 Immunochemischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot-Analyse)

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese zunächst 1 h bei Raumtemperatur mit einer 5 %igen Milchpulverlösung (in PBST) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit dem Erstantikörper, in Blockierungspuffer angesetzt, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die jeweils verwendeten Verdünnungen der Erstantikörper sind unter 2.1.5.1 angegeben. Danach wurde 4 x 15 min in PBST gewaschen, gefolgt von einer einstündigen Inkubation des Meerrettichperoxidasegekoppelten (HRP, „*horseradish peroxidase*“) Zweitantikörpers in einer 0,5 %igen Milchpulverlösung. Daraufhin wurde erneut 3 x 15 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit 0,2 ml/cm² ECL-Lösung der Firma GE Healthcare, München (1:1 Mischung der Kit-Komponenten nach Herstellerangaben) für 1 min gleichmäßig benetzt, in Klarsichtfolie eingepackt und in die Filmkassette eingelegt. Der belichtete Röntgenfilm wurde automatisch in einer Entwicklermaschine (Hyperprocessor, GE Healthcare) entwickelt. Zum Entfernen der gebundenen Antikörper wurde die Blotmembran zunächst mit Wasser für 10 min bei RT gewaschen und anschließend für weitere 60 min mit 2 ml/cm² „Stripping-Puffer“ in einer Plastikschaale inkubiert. Es folgten weitere Waschschriffe von 2 x 5 min mit Wasser. Danach wurde die Membran wie oben beschrieben behandelt.

2.7.7 Messung von Prostaglandin E₂ in Zellkulturüberständen mittels ELISA

Der PGE₂ Correlate EIATM-Kit der Firma Enzo Life Sciences ist ein kompetitiver Immunassay für die quantitative Bestimmung von PGE₂ in biologischen Flüssigkeiten. Bei diesem Assay ist anti Maus-IgG adsorptiv an die Well-Wände der Mikrotiterplatte gebunden. Durch Zugabe von den Mediumproben, Peroxidase-gekoppeltes PGE₂ und anti-PGE₂ kommt es zu einer Kompetition von Peroxidase-gekoppeltem und ungekoppeltem PGE₂ um den Antikörper. Der Antikörper bindet mit seinem Fc-Teil an der Oberfläche der Plattenvertiefungen und fixiert somit den Komplex an der Platte. Aus diesem Grund werden beim nachfolgenden Waschen nur überschüssige Reagenzien entfernt und der Komplex aus Antikörper und PGE₂ oder Alkalische-Phosphatase-gekoppeltem PGE₂ bleibt

gebunden. Als nächster Schritt wird das Alkalische-Phosphatase-Substrat zugegeben. Nur wenn das PGE₂, gekoppelt an ein Alkalische-Phosphatase-Molekül, an den Antikörper gebunden hat, kommt es zu einer gelblichen Farbentwicklung, die bei 405 nm in einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen werden kann. Unter Standardbedingungen ist die gemessene Enzymaktivität umgekehrt proportional zur Menge des spezifischen Antigens in der Probe. Der PGE₂-Standard wurde zwischen 2500 und 39,1 pg/ml gewählt.

Die Messung der PGE₂-Menge in Zellkulturüberständen der Mesangiumzellen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 100 µl des Zellkulturüberstandes oder des jeweiligen Standards zusammen mit 50 µl Konjugat (PGE₂, gekoppelt an ein Alkalische-Phosphatase-Molekül) und 50 µl der Antikörperlösung auf die Platte gegeben und für 2 h auf einem Plattenschüttler bei ca. 500 Upm und RT inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die überschüssigen Reagenzien durch dreimaliges Waschen der Vertiefungen mit Waschpuffer entfernt und die Platte durch Ausklopfen auf Küchenpapier getrocknet. Darauf folgte die Zugabe von 200 µl Alkalische-Phosphatase-Substrat. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei RT ohne Schütteln wurde die Enzymreaktion mit Hilfe 50 µl Stop-Puffer beendet und die Intensität der entstandenen Gelbfärbung bei 405 nm in einem Mikroplatten-Lesegerät (Tecan, Neustadt) ermittelt.

Zur Berechnung der Menge an gebundenem PGE₂ pro Probe in pg/ml wurden folgende Formeln angewendet:

1. Durchschnittliche Netto-Optische Dichte (OD) = durchschnittliche OD x NSB OD
2. Prozent gebunden = Netto OD/Netto B0 OD x 100
3. Steigung (m) der Standard-Kurve errechnen

$$y = m \ln(x) + b$$

4. Menge an PGE₂ errechnen

$$(\text{EXP}(- \% \text{ gebunden}/m + b/m))$$

B0 = maximale Bindung; NSB = nicht-spezifische Bindung

2.7.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe einer “*One way*-Analyse der Varianz” (ANOVA) oder des Student t-Tests durchgeführt. Dafür wurde das Statistikprogramm Minitab 13.0 (Minitab, State College, PA, USA) verwendet. Unterschiede mit $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von TZDs auf den Sphingolipidmetabolismus in Mesangiumzellen

Sphingolipide wie Ceramid, Sphingosin und S1P, werden in jüngster Vergangenheit über ihre Funktion als reine Membranbestandteile hinaus zunehmend als bioaktive Signalmoleküle verstanden, welche für die Pathogenese von Krebs oder chronisch entzündlichen Nierenerkrankungen von Bedeutung sind. Insbesondere die metabolisierenden Enzyme SK-1 und SK-2 stellen dabei interessante Angriffspunkte für eine pharmakologische Intervention dar. Zudem spielen bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse auch PPARs eine wichtige Rolle. Von den bisher drei identifizierten Isoformen (PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ), nutzt man die γ -Isoform, die durch TZDs aktiviert wird, welche in der Therapie des Diabetes Mellitus Typ 2 eingesetzt werden. Darüber hinaus werden den PPAR γ -Agonisten protektive Effekte auf die Entstehung und das Fortschreiten von chronischen, sowohl diabetisch als auch nicht-diabetisch induzierten Nierenerkrankungen und fibrotischen Prozessen zugesprochen [178-180].

Jedoch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht abschließend aufgeklärt. Aus diesem Grund sollte in diesem Teil der Arbeit der Wirkmechanismus von PPAR γ -Agonisten auf die SK-1 des Sphingolipidstoffwechsels analysiert werden, um so weitere Erklärungsansätze für die bekannten reno-protektiven Effekte und die anti-fibrotische Wirkung von TZDs zu erhalten.

3.1.1 Wirkung von TZDs auf die S1P-, Sphingosin und C16-Ceramid-Spiegel in Mesangiumzellen der Ratte

Um zunächst einen Überblick über die Wirkung von PPAR γ -Agonisten auf den Sphingolipidmetabolismus in Rattenmesangiumzellen zu erhalten, wurden die drei bioaktiven Sphingolipide S1P, Sphingosin (Sph) und C16-Ceramid (C16-Cer) mittels LC-MS/MS quantifiziert. Dafür wurden die Zellen mit 10-20 μ M TRO bzw. 20-50 μ M RSG für 24 h behandelt.

In Abb. 11A wird deutlich, dass in Zellen, die mit den genannten PPAR γ -Agonisten inkubiert wurden, signifikant mehr S1P gemessen wurde. Die Konzentration von C16-Cer

und Sph wurde durch die Stimulation mit TRO oder RSG nicht signifikant beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde S1P zeitabhängig nach einer 8-, 16- und 24-stündigen Inkubation mit 20 μM TRO bzw. 50 μM RSG mittels LC-MS/MS quantifiziert. Aus der Abb. 11B geht hervor, dass die Stimulation mit den PPAR γ -Agonisten auch nach 8, 16 und 24 h eine signifikante Akkumulation von S1P verursachte. Diese Daten lassen vermuten, dass TZDs an einer Aktivierung der SK, die Sphingosin als Substrat nutzt, um S1P zu bilden, beteiligt sind.

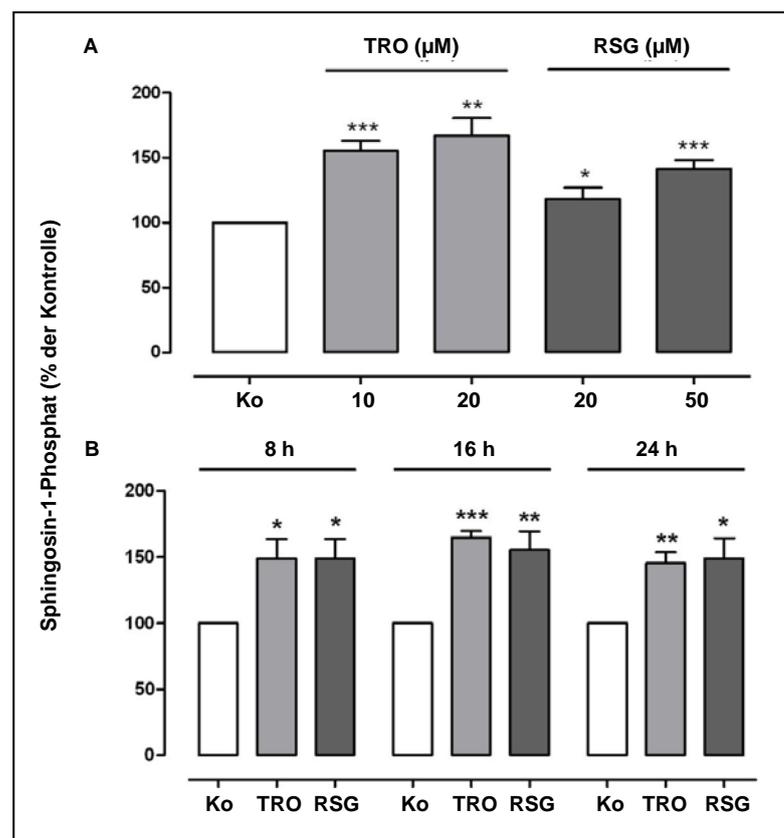


Abb. 11: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die zelluläre Konzentration von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in Mesangiumzellen der Ratte.

(A) Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen TRO (10-20 μM , hellgraue Balken) bzw. RSG (20-50 μM , dunkelgraue Balken) inkubiert. (B) Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden zeitabhängig für 8, 16 und 24 h mit 20 μM TRO (hellgraue Balken) bzw. 50 μM RSG (dunkelgraue Balken) inkubiert. Die anschließende Lipidextraktion wurde durch eine LC-MS/MS-Analyse wie im Methodenteil beschrieben quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte der Konzentration von S1P \pm SEM (n=4-5) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05, **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen.

3.1.2 Wirkung von TZDs auf die SK-1-Aktivität in Mesangiumzellen der Ratte

Aufgrund der in Abb. 11 erhaltenen LC-MS/MS-Daten wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob die gesteigerte S1P-Konzentration innerhalb der Zelle auf eine gesteigerte SK-1-Aktivität zurückzuführen ist. Dafür wurden Proteinlysate aus Mesangiumzellen der Ratte, die für 16 h mit steigenden Konzentrationen TRO (10-20 μM) und RSG (20-50 μM) behandelt wurden, einer SK-1-Aktivitätsmessung unterzogen (Abb. 12).

Wie aus der Abbildung hervorgeht, wurde ein signifikanter Anstieg der SK-1-Aktivität dosisabhängig durch eine Inkubation der Zellen mit TRO bzw. RSG hervorgerufen. Eine Inkubation der Zellen mit 20 μM TRO führte zu einer Aktivitätssteigerung der SK-1 um ca. 70 %. Nach der Behandlung von Rattenmesangiumzellen mit 50 μM RSG konnte ein Anstieg der SK-1-Aktivität auf 200 % gemessen werden.

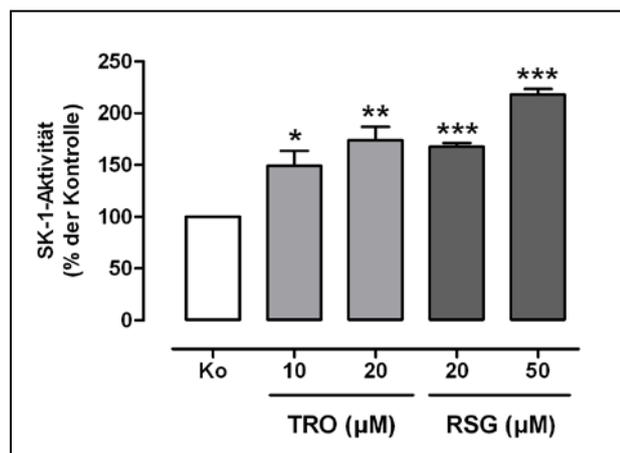


Abb. 12: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Sphingosinkinase-1 (SK-1)-Aktivität in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 16 h entweder mit Lösungsmittel (DMSO, weißer Balken), oder mit unterschiedlichen Konzentrationen TRO (10-20 μM , hellgraue Balken) bzw. RSG (20-50 μM , dunkelgraue Balken) inkubiert. Die Messung der Aktivität für die SK-1 wurde mit je 30 μg Protein durchgeführt. Die Aktivitätsdaten sind als % der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm SEM (n=3). *P < 0.05, **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen.

3.1.3 Wirkung von TZDs auf die Protein- und mRNA-Expression der SK-1 in Mesangiumzellen der Ratte

In der nächsten Versuchsreihe wurde zunächst analysiert, ob die gemessene Aktivitätssteigerung der SK-1 mit einer erhöhten Proteinexpression des Enzyms einhergeht. Dazu wurden Rattenmesangiumzellen, wie in Abb. 13 beschrieben, behandelt. Der dazugehörige Western Blot (Abb. 13) zeigt, dass eine 16-stündige Inkubation der Rattenmesangiumzellen mit sowohl TRO als auch mit RSG zu einer gesteigerten Proteinexpression der SK-1 führt.

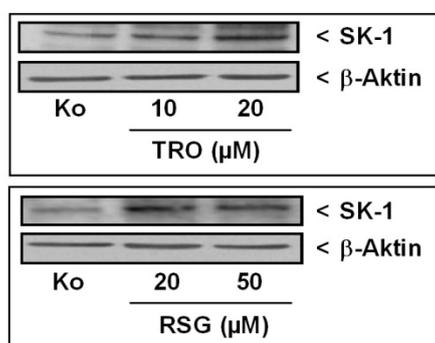


Abb. 13: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 16 h entweder mit DMSO, oder mit unterschiedlichen Konzentrationen TRO (10-20 µM) und RSG (20-50 µM) inkubiert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die SK-1 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β-Aktin bestimmt.

Desweiteren wurde die TZD-induzierte Proteinexpression der SK-1 durch eine Zeitkinetik- und Dosis-Wirkungskurve weiter charakterisiert. Dafür wurden Mesangiumzellen der Ratte mit steigenden Konzentrationen TRO (10-20 µM) sowie RSG (20-50 µM) für 8, 16 und 24 h inkubiert. Der größte Anstieg der SK-1 auf Proteinebene konnte jeweils nach 16 h gemessen werden (Abb. 14A).

Außerdem wurde untersucht, ob die TZD-vermittelte Induktion der SK-1-Aktivität und Proteinexpression auf eine erhöhte mRNA-Expression zurückgeführt werden können. Die Ergebnisse in Abb. 14B zeigen, dass TRO und RSG die mRNA-Expression nach 8 h dosisabhängig induzieren können. Die stärkste Induktion war mit 20 µM TRO und RSG im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Die mRNA-Expression der SK-2 wurde durch die Stimulation mit TZDs nicht beeinflusst (Abb. 14B).

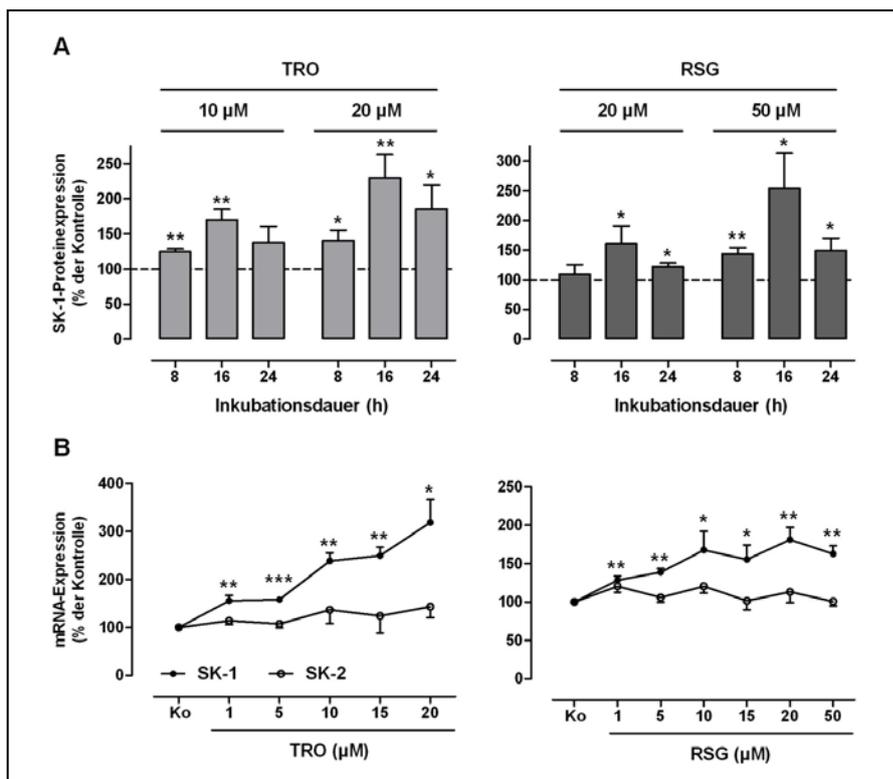


Abb. 14: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Protein- und mRNA-Expression der Sphingosinkinase-1 und -2 (SK-1 und -2) in Mesangiumzellen der Ratte.

(A) Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden mit den angegebenen TZD-Konzentrationen in µM und für die angegebenen Zeitdauern stimuliert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die SK-1 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β-Aktin bestimmt. Die Western-Blots wurden anschließend densitometrisch ausgewertet. (B) Ruhende Mesangiumzellen wurden mit den angegebenen TRO- und RSG-Konzentrationen für 8 h inkubiert. Die RNA wurde extrahiert und einer quantitativen Real-Time-PCR-Analyse unterzogen. Hierzu wurden spezifische Primer für die Ratten-SK-1 bzw. SK-2 verwendet und die Daten mit der gemessenen Konzentration an GAPDH mRNA normalisiert. Die Analysen wurden von Herr Dr. Alexander Koch durchgeführt (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Frankfurt). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=4-6) in % im Vergleich zur Kontrolle (gestrichelte Linie). *P < 0,05, **P < 0,01 und ***P < 0,001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen.

Auch nach 4 und 16 h war die mRNA-Expression der SK-1 signifikant erhöht (Ko (DMSO) = 100 ± 0; 4 h TRO = 163 ± 13,8** ; 16 h TRO = 203 ± 19,82*** ; 4 h RSG = 143 ± 34,0* ; 16 h RSG = 161 ± 34,1* ; Mittelwerte ± SEM (n = 4-6) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0,05, **P < 0,01 und ***P < 0,001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen). Gleichzeitig wurde die mRNA-Expression der SK-2 nach 4 und 16 h nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Wirkung von TZDs auf die Protein- und mRNA-Expression der SK-1 in humanen Mesangiumzellen und Mausmesangiumzellen

Anschließend wurde untersucht, ob die durch TZDs bedingte Hochregulation der SK-1 nicht nur auf die glomerulären Mesangiumzellen der Ratte beschränkt ist, sondern auch auf andere Spezies übertragbar ist. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit den PPAR γ -Agonisten TRO und RSG in primären humanen Mesangiumzellen und Mausmesangiumzellen durchgeführt.

Wie aus Abb. 15 hervorgeht, war die Proteinexpression der SK-1 in humanen Mesangiumzellen durch TRO und RSG dosisabhängig induziert. Dabei konnte eine signifikante Steigerung der SK-1-Expression auf ca. 150 % nach Behandlung der Zellen mit 20 μ M TRO gemessen werden. Eine Hochregulation der SK-1 bis auf 200 % war nach der Stimulation mit 50 μ M RSG messbar.

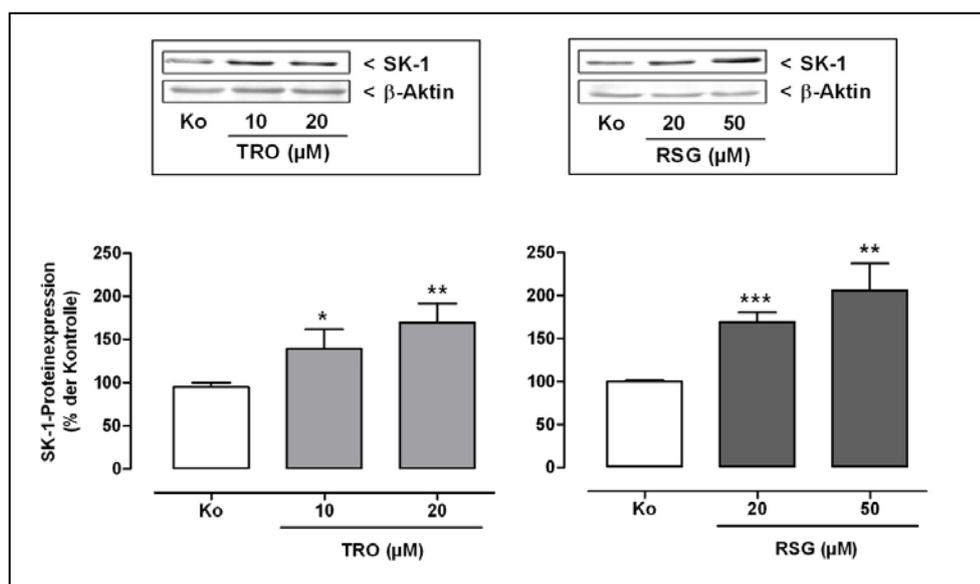


Abb. 15: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in humanen Mesangiumzellen.

Ruhende humane Mesangiumzellen wurden für 16 h entweder mit Lösungsmittel (DMSO, weißer Balken), oder mit unterschiedlichen Konzentrationen TRO (10-20 μ M, hellgraue Balken) und RSG (20-50 μ M, dunkelgraue Balken) inkubiert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die SK-1 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β -Aktin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=4) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05, **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen.

Die mRNA-Expression der SK-1 war wie bereits unter Punkt 3.1.3 in Rattenmesangiumzellen gezeigt werden konnte auch in humanen Mesangiumzellen nach einer 16-stündigen Inkubation mit 20 μ M TRO und RSG erhöht (Ko (DMSO) = 100 ± 0 ; TRO = $227 \pm 35,7^*$; RSG = $154 \pm 13,6^*$; Mittelwerte \pm SEM (n = 4-6) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen).

Um zu prüfen, ob der induzierende Effekt von TRO und RSG auf die Proteinexpression der SK-1 auch in Mausmesangiumzellen auftritt, wurden diese für 16 h mit 20 μ M TRO und 50 μ M RSG behandelt. Wie die Abb. 16 zeigt, stieg die Proteinexpression der SK-1 mit TRO auf über 150 % und mit RSG auf ca. 200 % signifikant an im Vergleich zu Kontrollbedingungen.

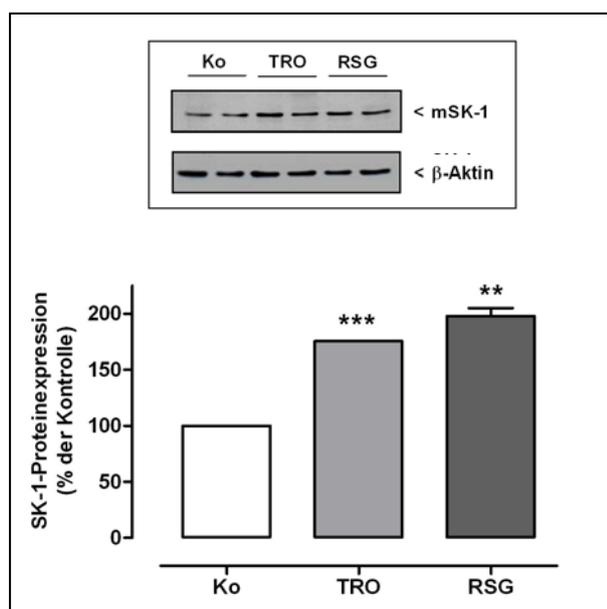


Abb. 16: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in Mesangiumzellen der Maus.

Ruhende Mesangiumzellen der Maus wurden für 16 h entweder mit Lösungsmittel (DMSO, weißer Balken), oder mit 20 μ M TRO (hellgrauer Balken) und 50 μ M RSG (dunkelgrauer Balken) inkubiert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die SK-1 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β -Aktin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle. **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen.

3.1.5 Wirkung von TZDs auf die SK-1 *in vivo*

Die bisherigen Daten zeigen, dass TZDs *in vitro* einen Einfluss auf den Sphingolipidmetabolismus in Ratten-, Maus- und primären humanen Mesangiumzellen haben. Ein besonderes Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf die SK-1 gelegt. In den nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob derselbe Effekt auch *in vivo* in Mäusen ausgelöst werden kann.

Dazu wurden C57BL/6-Mäuse mit 15 mg/kg Körpergewicht TRO und RSG über eine Schlundsonde behandelt. Nach 24 h wurden die Nieren entnommen, die Glomeruli mit einer differenzierenden Sieb-Methode isoliert und diese verschiedenen Messungen unterzogen.

Wie bereits in Ratten-, Maus- und humanen Mesangiumzellen *in vitro* ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression gemessen werden konnte, war auch *in vivo* die Expression der SK-1 mRNA signifikant erhöht (Ko (DMSO) = $100 \pm 10,7$; TRO = $192 \pm 30,0^*$; RSG = $362 \pm 96,5^*$; Mittelwerte \pm SEM (n = 3) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen).

Anschließend wurde die Proteinexpression der SK-1 *in vivo*, ermittelt, die ebenfalls signifikant erhöht war. So zeigte sich in diesen Zellen eine Steigerung der Proteinexpression nach der Behandlung von 15 mg/kg Körpergewicht TRO auf ca. 150 % und auf ca. 180 % mit RSG (Abb. 17).

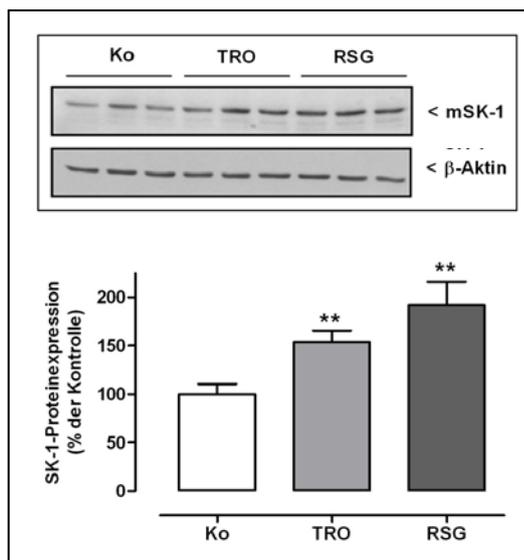


Abb. 17: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in Mäusen.

C57BL/6-Mäusen wurden über eine Schlundsonde entweder mit DMSO/Sonnenblumenöl (Kontrolle, weißer Balken) oder 15 mg/kg TRO (hellgrauer Balken) und RSG (dunkelgrauer Balken) behandelt. Nach 24 h wurden die Nieren entnommen und die Glomeruli mit einer differenzierenden Sieb-Methode isoliert. 30 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen die murine SK-1 und β-Aktin als Ladekontrolle analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=8 Tiere pro Gruppe) in % im Vergleich zur Kontrolle. **P < 0.01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO/Sonnenblumenöl behandelten Kontrollwerte angesehen.

3.1.6 Einfluss von PPAR γ auf die SK-1-Expression in Mesangiumzellen der Ratte

Für die Familie der Thiazolidindione werden in der Literatur von PPAR- γ sowohl abhängige als auch unabhängige Effekte beschrieben. Um sicherzustellen, dass es sich bei den bisher gezeigten Effekten von TZDs im Sphingolipidstoffwechsel, insbesondere der Expression und Aktivität der SK-1, um PPAR γ -abhängige Effekte handelt, sollten Wettbewerbsversuche mit dem PPAR γ -Antagonisten GW-9662 durchgeführt werden. Im Falle einer PPAR γ -abhängigen Regulation der SK-1 sollten die beobachteten Anstiege durch den Inhibitor aufgehoben werden.

Für diesen Versuch wurden Rattenmesangiumzellen für 4 h mit 20 µM des PPAR γ -Antagonisten GW-9662 vorinkubiert und anschließend mit 10 µM TRO und 20 µM RSG für weitere 16 h stimuliert.

Die Resultate in Abb. 18A konnten die Vermutung der PPAR γ -vermittelten Induktion der SK-1-Expression und Aktivität durch TZDs bestätigen. So konnte erwartungsgemäß die SK-1-mRNA-Expression mit 10 µM TRO bzw. 20 µM RSG statistisch signifikant auf etwa

das Doppelte erhöht werden. Die jeweilige Induktion der SK-1-mRNA-Expression konnte durch Vorbehandlung mit dem PPAR γ -Antagonisten GW-9662 verhindert werden, was eine Involvierung dieses Rezeptors auch in der TZD-induzierten Stimulation der SK-1-Expression deutlich unterstreicht.

Wie aus der Abb. 18B hervorgeht, inhibierte GW-9662 auch die Aktivität der SK-1 nach Stimulation mit TRO und RSG.

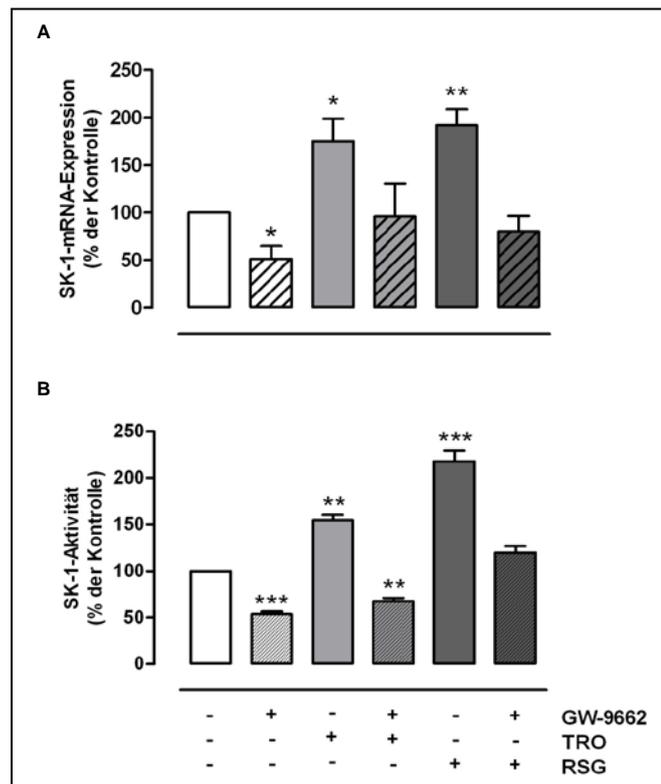


Abb. 18: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) und GW-9662 auf die mRNA-Expression und Aktivität der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden mit 20 μ M GW-9662 für 4 h vorinkubiert und anschließend mit 10 μ M TRO und 20 μ M RSG für 16 h inkubiert. (A) Die RNA wurde extrahiert und einer quantitativen Real-Time-PCR-Analyse unterzogen. Hierzu wurden spezifische Primer für die Ratten-SK-1 verwendet und die Daten mit der gemessenen Konzentration an GAPDH mRNA normalisiert. Die Analysen wurden von Herr Dr. Alexander Koch durchgeführt (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Frankfurt). (B) Die Messung der Aktivität für die SK-1 wurde mit je 30 μ g Protein durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4-6) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05, **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen.

3.1.7 Wirkung von TZDs auf die Promotoraktivität der SK-1 in Mesangiumzellen der Ratte

Aus den vorangegangenen Daten geht hervor, dass die Protein- und mRNA-Expression der SK-1 durch die Stimulation mit TZDs gesteigert wird. Daher ist zu erwarten, dass diese Regulierungen auf eine Aktivierung des Promotors des SK-1-Gens zurückzuführen ist. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde eine Analyse des Promotors der Ratten-SK-1 (rSK-1) durchgeführt. Literaturrecherchen ergaben, dass der Promotor sieben putative PPREs aufweist, hier bezeichnet als PPRE 1-7 (Abb. 19A). Um diese auf ihre Funktionalität zu untersuchen, wurden ein 4009 bp (rSK-1 I) langes und zwei kürzere Fragmente des Promotors mit einer Länge von 2415 bp (rSK-1 II) und 822 bp (rSK-1 III) 5'-aufwärts des 5'-UTRs des SK-1 Gens kloniert. Das 4009 bp-Fragment enthält die PPREs 1-7, wohingegen das 2415 bp-Fragment die PPREs 5-7 und das kürzeste Promotorfragment nur das PPRE 7 beinhaltet. Des Weiteren wurde eine PPRE 7 Punktmutante (Δ PPRE7) in rSK-1 I und rSK-1 III kloniert. Diese Fragmente wurden in ein Luciferase-Reporter-Konstrukt kloniert und konnten nach ihrer transienten Transfektion näher untersucht werden. Da sich Rattenmesangiumzellen nur sehr schwer transfizieren lassen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den folgenden Experimenten *Normal Rat Kidney* (NRK) Zellen verwendet.

Abb. 19B verdeutlicht, dass alle drei Promotorfragmente durch TRO bzw. RSG aktivierbar sind. So zeigte das 4009 bp-lange Fragment (rSK-1 I) eine signifikante Aktivitätssteigerung auf ca. 250 % nach Inkubation mit 20 μ M TRO und auf ca. 180 % nach Behandlung mit 50 μ M RSG für 16 h. Das mittlere Fragment rSK-1 II wies einen Anstieg der Aktivität auf ca. 190 % mit TRO und auf ca. 130 % mit RSG auf. Auch das kleinste Fragment rSK-1 III mit nur einem PPRE (PPRE 7) zeigte eine Aktivitätssteigerung mit TRO auf etwa 170 % und mit RSG auf ca. 140 %. Um die funktionelle Rolle des PPRE 7 zu testen, wurde zusätzlich eine PPRE 7 Punktmutante (Δ PPRE 7) in den Fragmenten rSK-1 I und rSK-1 III kloniert. Auch das größte Fragment mit der Punktmutante war nach Stimulation mit TRO auf ca. 200 % und mit RSG auf ca. 140 % aktivierbar, wohingegen das kleinste Fragment rSK-1 III mit der PPRE 7 Punktmutante nach Behandlung mit TRO bzw. RSG keine Aktivitätssteigerung mehr zeigte (Abb. 19C). Diese Daten zeigen, dass das PPRE 7 funktionell aktiv ist. Der verminderte Anstieg der Aktivität im 4009 bp-langen Fragment (rSK-1 I) lässt vermuten, dass jedoch mindestens noch ein weiteres funktionelles PPRE in diesem Konstrukt vorhanden sein muss.

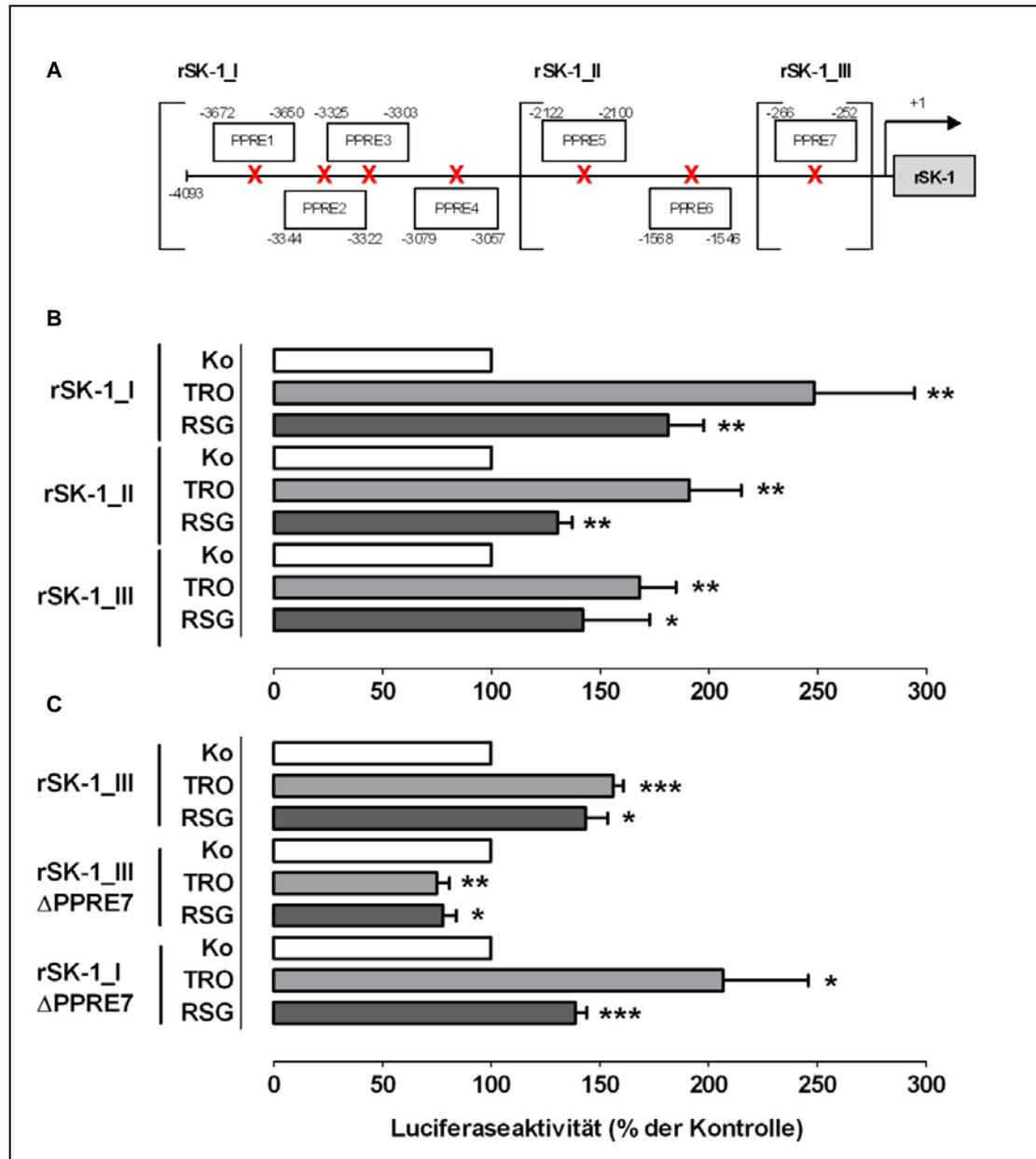


Abb. 19: Schematische Übersicht der klonierten Promotorfragmente der Sphingosinkinase-1 (SK-1) mit dem deletierten *peroxisome proliferator response element 7* (PPRE 7) und die Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Promotoraktivität der SK-1 in Normal Rat Kidney (NRK) Zellen.

(A) Schematische Übersicht über den SK-1-Promotor der Ratte (rSK-1 I) inklusive der kürzeren Promotorfragmente rSK-1 II und rSK-1 III mit den putativen PPREs 1-7.

(B+C) Ruhende NRK-Zellen wurden für 6 h mit verschiedenen Fragmenten des SK-1-Promotors der Ratte sowie mit einem Plasmid, welches für die *Renilla*-Luciferase kodiert, kotransfiziert. Dargestellt sind in (B) die drei Promotorfragmente I-III mit einer Länge von 4009 bp, 2414 bp bzw. 822 bp, sowie in (C) das Promotorfragment III und die Punktmutante Δ PPRE 7 in Fragment I und III. Die Zellen wurden anschließend für 16 h entweder mit Lösungsmittel (DMSO, weiße Balken), 20 μ M Troglitazon (TRO, hellgraue Balken) oder mit 50 μ M Rosiglitazon (RSG, dunkelgraue Balken) inkubiert, nach Herstellerangaben lysiert und dem Promotorassay unterzogen. Die gemessene Promotoraktivität wurde auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivität normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen Luciferase-Aktivität \pm SEM (n=3) in %. *P < 0.05, **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte der einzelnen Promotorkonstrukte angesehen.

3.1.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Um zu überprüfen, ob PPRE 7 spezifisch PPARs bindet, wurde ein EMSA durchgeführt. Hierfür wurde die Bindung DIG-markierter Oligonukleotide mit der PPRE 7-Sequenz oder der mutierten Sequenz von PPRE 7 (Δ PPRE 7) zu nukleären Proteinen von TZD-behandelten oder unbehandelten Zellen verglichen (Abb. 20). Für die Herstellung der Kernextrakte wurden Rattenmesangiumzellen für 16 h mit 20 μ M TRO bzw. 50 μ M RSG behandelt. Die Inkubation von Kernextrakten mit dem PPRE 7-Motiv führte zur Bildung von DNA-Protein-Komplexen (Abb. 20 Spur 2, 4 und 5) im Vergleich zur freien Probe, die kein Protein enthält (Spur 1). Ein 20-facher Überschuss von nicht DIG-markiertem PPRE 7 Oligonukleotid als Kompetitor führte zu einem Verschwinden der DNA-Protein-Bande des DIG-markierten PPRE 7 Oligonukleotids (Spur 3). Dies bedeutet, dass die Entstehung der Banden im EMSA tatsächlich durch eine spezifische Bindung der markierten Sonde hervorgerufen wird und nicht durch unspezifische Bindungsreaktionen.

Im Gegensatz dazu bildeten DIG-markierte Oligonukleotide, die die mutierte Sequenz von PPRE 7 (Δ PPRE 7) enthielten, mit TZDs behandelten Zellen keine DNA-Protein-Komplexe aus. Es ergab sich kein Unterschied in der Ausbildung von DNA-Protein-Komplexen bei Einsatz von Extrakten aus induzierten (Spur 8 und 9) und aus Kontrollzellen (Spur 7) im Vergleich zur freien Probe (Spur 6). Diese Daten zeigen, dass PPRE 7 funktionell aktiv und spezifisch Komplexe mit den Kernproteinen, vermutlich PPAR γ , bildet und so zu einer Aktivierung des rSK-1 Promotors mit TZDs führt.

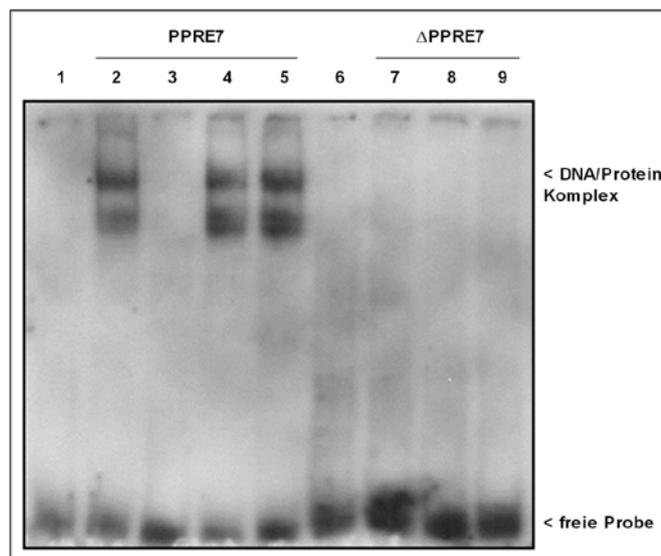


Abb. 20: Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) für das *peroxisome proliferator response element 7* (PPRE 7) mit Kernextrakten aus Thiazolidindionen (TZDs)-stimulierten Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 16 h mit DMSO, oder mit 20 μ M TRO und 50 μ M RSG behandelt. 5 μ g der davon isolierten Kernextrakte wurden mit 0,4 ng DIG-markierten Oligonukleotiden mit der PPRE 7 Sequenz (Spur 2-5) oder der mutierten Sequenz von PPRE 7 (Δ PPRE 7, Spur 7-9) inkubiert. Zellen mit DMSO (Spur 2 und 7), TRO (Spur 4 und 8) und mit RSG (Spur 5 und 9) behandelt. Freie Probe (Spur 1 und 6). 20-facher Überschuss der unmarkierten Sonde von PPRE 7 (Spur 3).

3.2 Wirkung von TZDs auf die CTGF-Expression

Jüngst konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass eine vermehrte iS1P-Produktion durch Überexpression der SK-1 einen hemmenden Einfluss auf die TGF- β induzierte Expression des pro-fibrotischen Bindegewebswachstumsfaktors CTGF ausüben kann [82]. Damit gelang erstmals der Nachweis, dass die Beeinflussung von Sphingolipiden und ihrer metabolisierenden Enzyme einen protektiven Effekt auf das Fortschreiten von fibrotischen Prozessen haben kann. Im ersten Dateinteil meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass eine Inkubation von Rattenmesangiumzellen mit den PPAR γ -Agonisten TRO und RSG zu einer vermehrten Expression (mRNA, Protein) und Aktivität der SK-1 führt. In den nachfolgenden Experimenten sollen die Effekte von TZDs auf die Proteinexpression des fibroserelevanten Markers CTGF analysiert werden um so TZDs als mögliche anti-fibrotische Medikamente weiter zu evaluieren.

3.2.1 Wirkung von TZDs auf die CTGF-Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte, Maus und Mensch

Aufgrund der unter 3.2 beschriebenen Reduktion des CTGF sollte zunächst untersucht werden wie sich TZDs auf das Expressionsverhalten von CTGF auswirken. Dafür wurden zum einen Rattenmesangiumzellen und humane Mesangiumzellen für 16 h mit steigenden Konzentrationen an TRO (10-20 μM) und RSG (20-50 μM) behandelt und die erhaltenen Zellkulturüberstände auf 10 %ige SDS-Gele aufgetragen. Die dazugehörigen Western Blots (Abb. 21A/B) zeigen, dass eine 16-stündige Inkubation der Mesangiumzellen sowohl mit TRO als auch mit RSG zu einer verringerten Proteinexpression von CTGF führen. Desweiteren wurden Proteinlysate aus isolierten Glomeruli von behandelten C57BL/6-Mäusen mit 15 mg/kg Körpergewicht TRO und RSG verwendet. Der dazugehörige Western Blot (Abb. 21C) zeigt, dass auch in Mesangiumzellen der Maus eine Behandlung mit TZDs eine Reduktion der CTGF-Proteinexpression hervorruft.

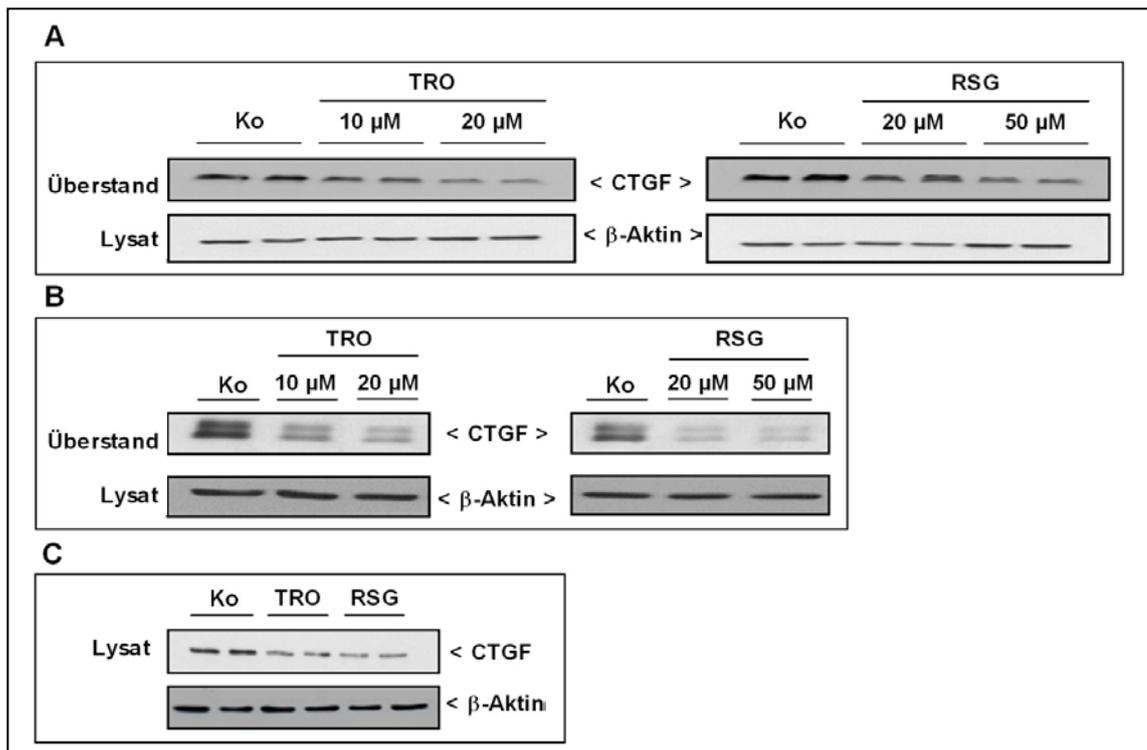


Abb. 21: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression von *connective tissue growth factor* (CTGF) in Mesangiumzellen.

Ruhende Mesangiumzellen (A: Ratte; B: Mensch) wurden für 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen TRO (10-20 μM) und RSG (20-50 μM) behandelt. (C) Proteinlysate aus isolierten Glomeruli von C57BL/6-Mäusen, wurden für 16 h mit 20 μM TRO und 50 μM RSG stimuliert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und mit Trichloressigsäure (70 %) präzipitiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (Lysat) und 30 μg Gesamtprotein, sowie der präzipitierte Zellkulturüberstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen CTGF und β -Aktin als Ladekontrolle analysiert. Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2.2 Wirkung von TZDs, TGF- β und SKI II auf die CTGF-Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte

Wie bereits eingangs erwähnt, konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass in verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten und Podozyten die SK-1 durch Inkubation mit TGF- β verstärkt exprimiert werden kann [82]. Zudem kann eine Überexpression der SK-1 einen hemmenden Einfluss auf die durch TGF- β induzierte Expression von CTGF ausüben. Um nun herauszufinden, ob TGF- β auch in Rattenmesangiumzellen die Expression von CTGF induzieren kann und ob dieser Effekt pharmakologisch durch SKI II verstärkt werden kann, wurden Rattenmesangiumzellen, wie in Abb. 22 beschrieben, behandelt. Wie bereits Ren *et al.* 2009 [82] zeigen konnte, geht aus der Abb. 22A hervor, dass eine Inkubation der Rattenmesangiumzellen mit 1 nM TGF- β für 24 h zu einer verstärkten Expression von CTGF führt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt durch eine zusätzliche Vorstimulation der Zellen mit 10 μ M SKI II für 1 h und anschließender TGF- β Behandlung für 24 h intensiviert werden kann. Diese Daten zeigen, dass auch in Rattenmesangiumzellen die SK-1 einen protektiven Effekt auf das Fortschreiten von fibrotischen Prozessen haben kann.

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die in Abb. 21B gezeigte verringerte CTGF-Expression durch TZDs auf eine gesteigerte SK-1-Aktivität zurückzuführen ist und durch den SK-1-Inhibitor SKI II wieder aufgehoben werden kann. Dafür wurden Rattenmesangiumzellen mit 10 μ M SKI II und zusätzlich 20 μ M TRO bzw. 50 μ M RSG für 16 h inkubiert. Aus der Abb. 22B wird deutlich, dass die reduzierte CTGF-Expression durch TRO bzw. RSG durch die parallele Stimulation des SK-1-Inhibitors wieder aufgehoben werden kann und die CTGF-Expression im Vergleich zur Kontrolle verstärkt wird.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die verringerte CTGF-Expression durch 20 μ M TRO bzw. 50 μ M RSG dosisabhängig durch SKI II (1-10 μ M) zumindest teilweise wieder aufgehoben werden kann (Abb. 22C). Eine Inkubation der Zellen mit 10 μ M SKI II und 20 μ M TRO bzw. 50 μ M RSG für 16 h bewirkte eine signifikante Steigerung der CTGF-Expression um ca. 30 %.

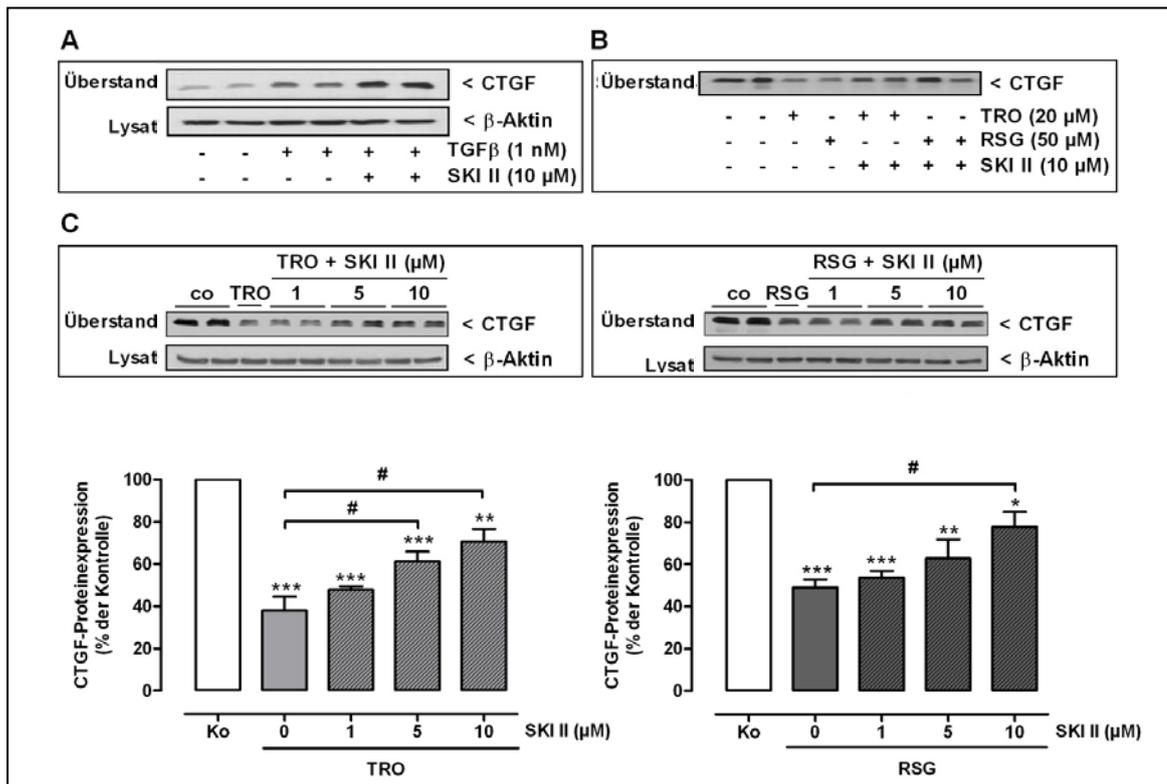


Abb. 22: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs), *transforming growth factor- β* (TGF β) und dem Sphingosinkinase-1-Inhibitor (SKI II) auf die Proteinexpression von *connective tissue growth factor* (CTGF) in Mesangiumzellen der Ratte.

(A) Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 1 h mit SKI II vorinkubiert und anschließend für 24 h mit 10 μ M TGF- β stimuliert. (B, C) Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 16 h parallel mit 20 μ M TRO (hellgraue Balken) und 50 μ M RSG (dunkelgraue Balken) und steigenden Konzentrationen an SKI II (1-10 μ M) behandelt. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und mit Trichloressigsäure (70 %) präzipitiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (Lysat) und 30 μ g Gesamtprotein, sowie der präzipitierte Zellkulturüberstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen CTGF und β -Aktin als Ladekontrolle analysiert. Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten sowie Mittelwerte \pm SEM (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0,05, **P < 0,01 und ***P < 0,001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die unbehandelten Zellen (Kontrollen) und #P < 0,05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit TRO und RSG behandelten Kontrollwerte angesehen.

3.2.3 Wirkung von TZDs auf die CTGF-Proteinexpression in Mesangiumzellen der Maus

Um den Effekt von SKI II zu überprüfen, wurden Mausmesangiumzellen, isoliert aus SK-1^{-/-}-Mäusen verwendet und mit Zellen, isoliert aus WT C57BL/6-Mäusen, verglichen. Für diesen Versuch wurden die Zellen 16 h mit 20 μ M TRO und 50 μ M RSG behandelt und anschließend die CTGF-Proteinexpression bestimmt. Wie aus Abb. 23 hervorgeht, konnte der reduzierende Effekt von TRO und RSG in WT-Mausmesangiumzellen auf die CTGF-Proteinexpression im Vergleich zu SK-1^{-/-}-Zellen vollständig aufgehoben werden.

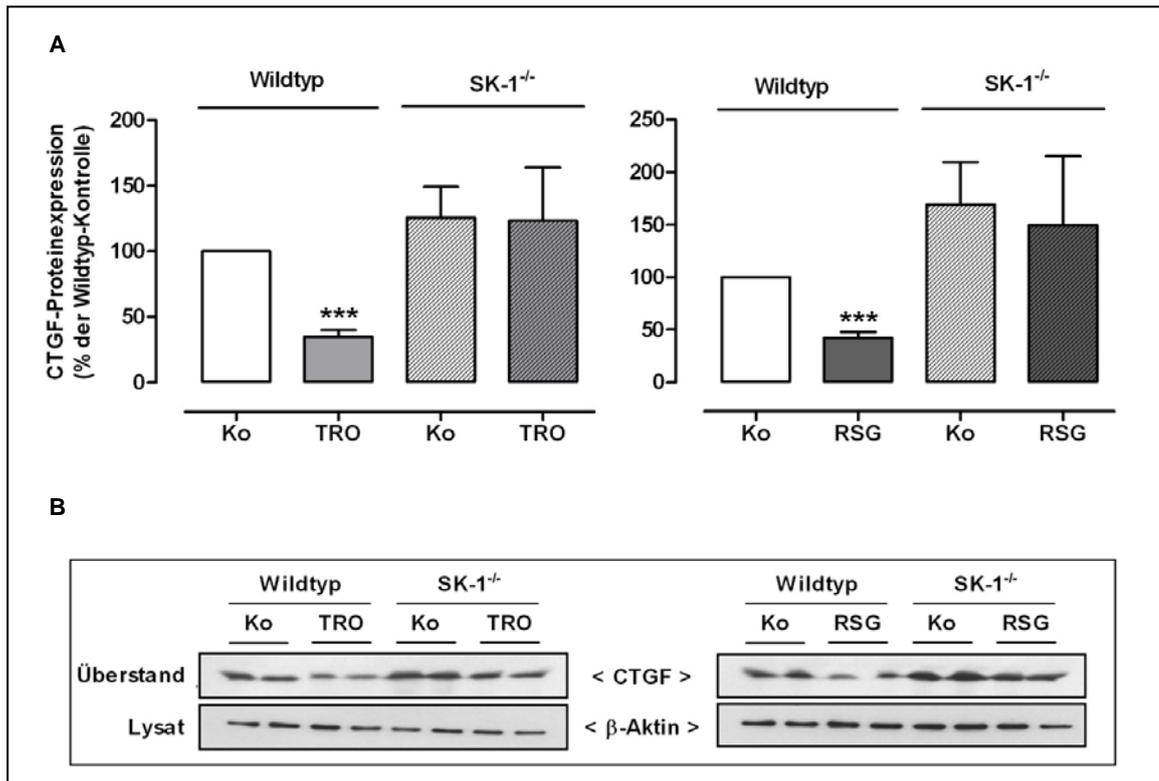


Abb. 23: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression von *connective tissue growth factor* (CTGF) in Wildtyp (WT)- und SK-1^{-/-}-Mesangiumzellen der Maus.

Ruhende Maus Mesangiumzellen (WT und SK-1^{-/-}) wurden für 16 h mit 20 µM TRO (hellgraue Balken) und 50 µM RSG (dunkelgraue Balken) behandelt. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und mit Trichloressigsäure (70 %) präzipitiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (Lysat) und 30 µg Gesamtprotein, sowie der präzipitierte Zellkulturüberstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen CTGF und β-Aktin als Ladekontrolle analysiert. Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten sowie Mittelwerte ± SEM (n=3-4) in % im Vergleich zu WT-Kontrollzellen. ***P < 0.001 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte der WT-Zellen angesehen.

Zusätzlich sollte im nachfolgenden Experiment geklärt werden, ob derselbe Effekt auch *in vivo* in Mäusen ausgelöst werden kann.

Dazu wurden C57BL/6 und SK1^{-/-}-Mäusen 15 mg/kg Körpergewicht TRO und RSG über eine Schlundsonde behandelt.

Nach 24 h wurden die Nieren entnommen, die Glomeruli mit einer differenzierenden Sieb-Methode isoliert und die Proteinexpression von CTGF analysiert.

Abb. 24 zeigt, dass auch *in vivo* die CTGF-Proteinexpression in Zellen, isoliert aus behandelten WT-Mäusen mit TZDs, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant auf ca. 50 % verringert wird. In isolierten Zellen aus SK-1^{-/-}-Mäusen, die ebenfalls mit TZDs behandelt wurden, konnte keine Regulation der CTGF-Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen werden. In Abb. 24 konnte außerdem

gezeigt werden, dass die Expression der SK-1 mRNA und Proteine in Glomeruli von WT-Mäusen nach Stimulation mit TZDs signifikant erhöht war.

Diese Experimente zeigen, dass durch die Aktivierung der SK-1 über TZDs und die damit verbundene Reduktion von CTGF PPAR γ -Agonisten als mögliche anti-fibrotische Medikamente eingesetzt werden könnten.

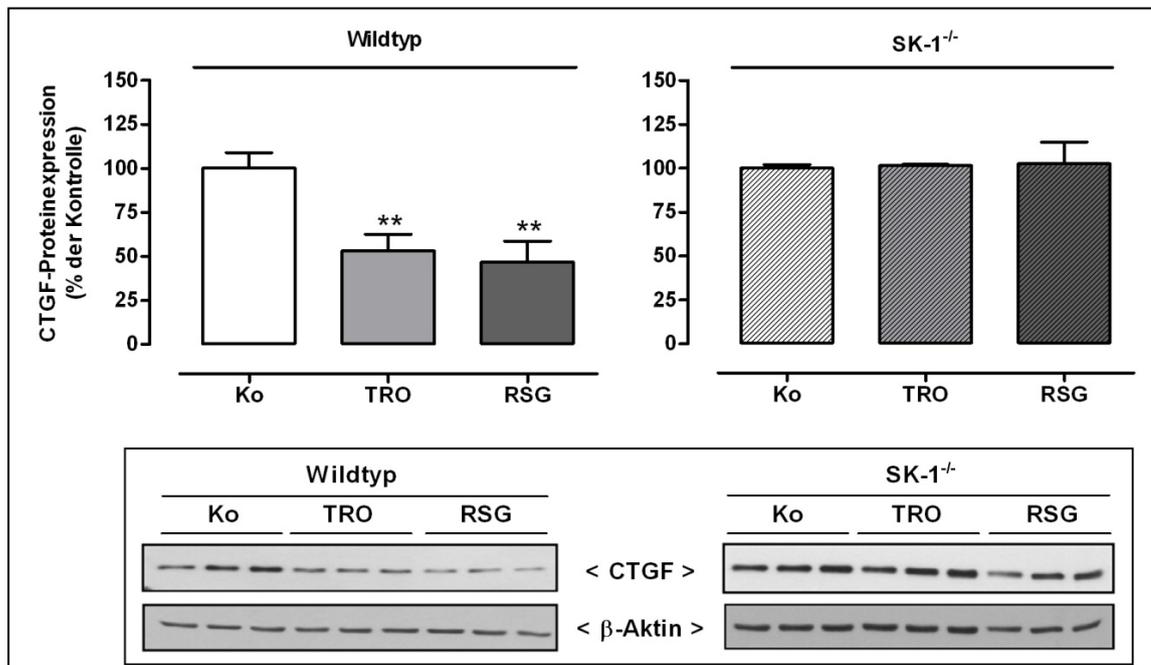


Abb. 24: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die *connective tissue growth factor* (CTGF) Proteinexpression in Mäusen.

C57BL/6 und SK-1^{-/-}-Mäusen wurden über eine Schlundsonde entweder mit DMSO/Sonnenblumenöl (Kontrolle, weißer Balken) oder 15 mg/kg TRO (hellgrauer Balken) und RSG (dunkelgrauer Balken) behandelt. Nach 24 h wurden die Nieren entnommen und die Glomeruli mit einer differenzierenden Sieb-Methode isoliert. 30 μ g Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen die CTGF und β -Aktin als Ladekontrolle analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=8 Tiere pro Wildtyp-Gruppe; n=3 Tiere für SK-1^{-/-}-Gruppe) in %. **P < 0.01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO/Sonnenblumenöl behandelten Kontrollwerte angesehen.

3.3 Wirkung von PPAR γ -Agonisten auf den S1P₁-Rezeptor

Im vorangehenden Kapitel wurde beschrieben, dass TRO und RSG die Expression und Aktivität der SK-1 induzieren. Diese Effekte wiederum resultierten in erhöhten, iS1P-Konzentrationen und verringerten CTGF-Konzentrationen. Diese Daten zeigen, dass die verwendeten PPAR γ -Agonisten in Mesangiumzellen über eine Beeinflussung des Sphingolipidstoffwechsels anti-fibrotisch wirken können. In diesem Zusammenhang könnte die Aktivierung von PPAR γ durch TZDs eine wirksame Therapieoption für die Behandlung von entzündlichen Nierenerkrankungen sein. Um weitere wertvolle Erkenntnisse auf die Progression von Nierenerkrankungen zu gewinnen, wurde der Wirkmechanismus von TZDs auf die verschiedenen S1PRs in Mesangiumzellen untersucht.

In Einklang mit den Daten von Gennero *et al.* (2002) [65], konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die S1PRs S1P₁₋₃ und der S1P₅-Rezeptor in Mesangiumzellen der Ratte exprimiert werden. Darüber hinaus war die S1P₁-Rezeptor-mRNA-Expression mit 20 μ M TRO auf das 400-fache und mit 20 μ M RSG auf das 250-fache in Rattenmesangiumzellen hoch reguliert (pers. Mitteilung Dr. Alexander Koch).

Um zu analysieren, ob die gemessene Steigerung der S1P₁-Rezeptor-mRNA-Expression mit einer erhöhten Proteinexpression des Rezeptors einhergeht, wurden Rattenmesangiumzellen, wie in Abb. 25 beschrieben, behandelt. Der dazugehörige Western Blot zeigt, dass eine 16-stündige Inkubation der Rattenmesangiumzellen sowohl mit TRO als auch mit RSG zu einer signifikant gesteigerten Proteinexpression des S1P₁-Rezeptors führt.

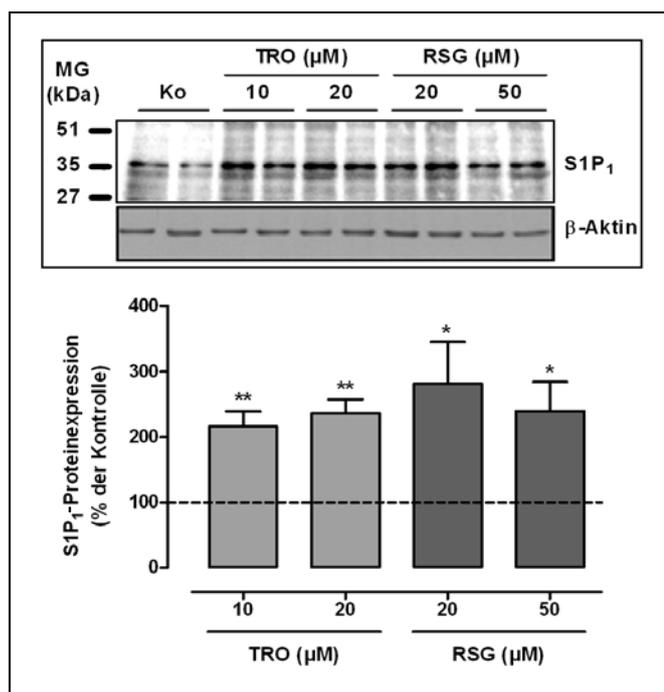


Abb. 25: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression des S1P₁-Rezeptors in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 16 h entweder mit Lösungsmittel (DMSO), oder mit unterschiedlichen Konzentrationen TRO (10-20 μM, hellgraue Balken) und RSG (20-50 μM, dunkelgraue Balken) inkubiert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 μg Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen S1P₁-Rezeptor analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β-Aktin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle (gestrichelte Linie). *P < 0.05 und **P < 0.01 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollwerte angesehen.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von TZDs auf den S1P₁-Rezeptor auf transkriptioneller Ebene untersucht. Dafür wurde die Promotorregion des Ratten-S1P₁-Rezeptors analysiert und Literaturrecherchen ergaben, dass der Promotor ein PPRE aufweist. Um dieses auf seine Funktionalität zu untersuchen, wurde ein 886 bp-langes Fragment des Promotors kloniert (Abb. 26A). Des Weiteren wurde das PPRE durch eine Punktmutation mutiert und in das 886 bp-lange Fragment eingefügt (ΔPPRE). Dieses Fragment wurde in ein Luciferase-Reporter-Konstrukt kloniert und konnte nach Transfektion näher untersucht werden. Da sich Rattenmesangiumzellen nur sehr schwer transfizieren lassen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den folgenden Experimenten NRK-Zellen verwendet.

Abb. 26B verdeutlicht, dass das S1P₁-Rezeptor-Promotorfragment durch TRO bzw. RSG aktivierbar ist. So zeigte das 886 bp-lange Fragment eine signifikante Aktivitätssteigerung auf ca. 190 % nach Inkubation mit 20 μM TRO und auf ca. 320 % nach Behandlung mit 50 μM RSG für 16 h. Um die funktionelle Rolle des PPRE zu testen, wurde zusätzlich eine

PPRE Punktmutante (Δ PPRE) in das Fragment kloniert. Das Fragment mit der Punktmutante zeigte nach Behandlung mit TRO bzw. RSG keine Aktivitätssteigerung mehr. Diese Daten zeigen, dass das PPRE funktionell aktiv ist.

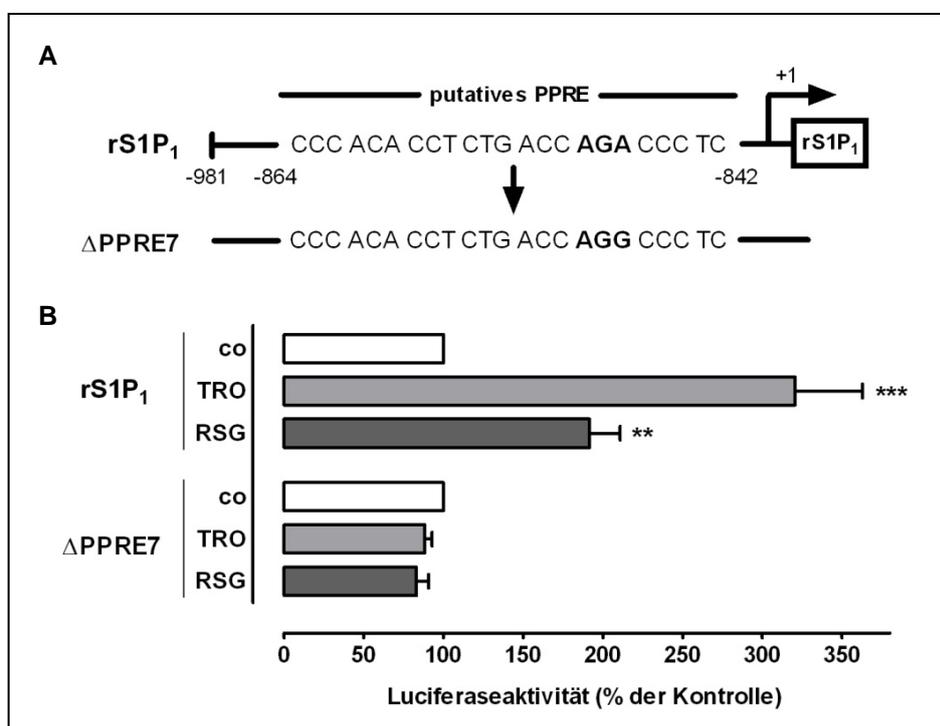


Abb. 26: Schematische Zeichnung des klonierten S1P₁-Rezeptor-Promotorfragments der Ratte (rS1P₁) mit dem deletierten *peroxisome proliferator response element* (PPRE) und die Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die S1P₁-Rezeptor-Promotoraktivität in *Normal Rat Kidney* (NRK)-Zellen.

(A) Schematische Übersicht über den Ratten S1P₁-Rezeptor (rS1P₁)-Promotor mit dem putativen PPRE. Zusätzlich ist die PPRE-Punktmutante (Δ PPRE) dargestellt. (B) Ruhende NRK-Zellen wurden für 6 h mit dem S1P₁-Rezeptor-Promotorfragment sowie mit einem Plasmid, welches für die *Renilla*-Luciferase kodiert, kotransfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 16 h entweder mit Lösungsmittel (DMSO, weiße Balken), 20 μ M TRO (hellgraue Balken) oder mit 50 μ M RSG (dunkelgraue Balken) inkubiert, nach Herstellerangaben lysiert und dem Promotorassay unterzogen. Die gemessene Promotoraktivität wurde auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivität normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen Luciferase-Aktivität \pm SEM (n=3) in %. **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte der einzelnen Promotorkonstrukte angesehen.

Um die Funktionalität des PPRE weiterhin zu charakterisieren wurde ein EMSA durchgeführt. Hierfür wurde die Bindung DIG-markierter Oligonukleotide mit der PPRE-Sequenz oder der mutierten Sequenz von PPRE (Δ PPRE) zu nukleären Proteinen von TZD-behandelten oder unbehandelten Zellen verglichen (Abb. 27). Für die Herstellung der Kernextrakte wurden Rattenmesangiumzellen für 16 h mit 20 μ M TRO bzw. 50 μ M RSG behandelt. Die Inkubation von Kernextrakten mit dem PPRE-Motiv führte zur Bildung von DNA-Protein-Komplexen (Abb. 27 Spur 2, 4 und 5) im Vergleich zur freien Probe, die

kein Protein enthält (Spur 1). Ein 20-facher Überschuss von nicht DIG-markiertem PPRE Oligonukleotid als Kompetitor führte zu einem Verschwinden der DNA-Protein-Bande des DIG-markierten PPRE Oligonukleotids (Spur 3). Dies bedeutet, dass eine Entstehung der Banden im EMSA tatsächlich durch eine spezifische Bindung der markierten Sonde hervorgerufen wird und nicht durch unspezifische Bindungsreaktionen.

Im Gegensatz dazu bildeten DIG-markierte Oligonukleotide, die die mutierte Sequenz von PPRE (Δ PPRE) enthielten, mit TZDs behandelten Zellen keine DNA-Protein-Komplexe aus. Es ergab sich kein Unterschied in der Ausbildung von DNA-Protein-Komplexen bei Einsatz von Extrakten aus induzierten (Spur 8 und 9) und aus Kontrollzellen (Spur 7) im Vergleich zur freien Probe (Spur 6). Diese Daten zeigen, dass das PPRE funktionell aktiv und spezifisch Proteine – vermutlich PPAR γ – binden und so eine Aktivierung des S1P $_1$ -Rezeptor-Promotors durch TZDs bewirken.

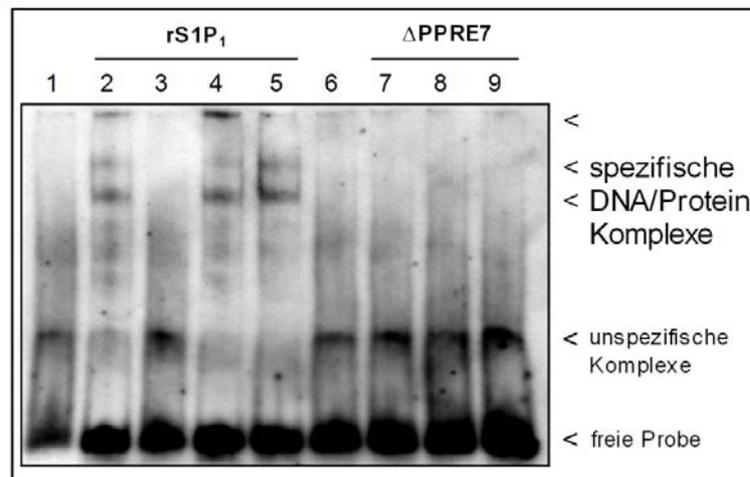


Abb. 27: Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) für das peroxisome proliferator response element (PPRE) aus dem S1P $_1$ -Rezeptor-Promotor der Ratte (rS1P $_1$) mit Thiazolidindionen (TZDs) an Kernextrakten aus Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 16 h mit DMSO, oder mit 20 μ M TRO und 50 μ M RSG behandelt. 5 μ g der davon isolierten Kernextrakte wurden mit 0,4 ng DIG-markierten Oligonukleotiden mit der PPRE Sequenz (Spur 2-5) oder der mutierten Sequenz von PPRE (Δ PPRE, Spur 7-9) inkubiert. Zellen mit DMSO (Spur 2 und 7), TRO (Spur 4 und 8) und mit RSG (Spur 5 und 9) behandelt. Freie Probe (Spur 1 und 6). 20-facher Überschuss der unmarkierten Sonde von PPRE (Spur 3).

3.4 Wirkung von extrazellulärem S1P auf die Expression der COX-2

Neben seiner Wirkung als intrazellulärer *second messenger* vermittelt S1P wichtige Funktionen auch extrazellulär durch spezifische Bindung an GPCRs. Es wurden bisher 5 verschiedene S1PRs (S1P₁₋₅) beschrieben, die an G_{i/o}-, G_q- und G_{12/13}-Proteine koppeln und deren Aktivierung verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration regulieren.

Zudem konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass S1P in der Lage ist die COX-2 zu induzieren und die Induktion gewebeabhängig über verschiedene Signalwege durch unterschiedlich aktivierte S1PRs erfolgen kann [137, 140, 153-154]. Allerdings konnten die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Signaltransduktion von S1P auf die COX-2 und die aus diesen Beobachtungen resultierende pathophysiologische Relevanz in glomerulären Mesangiumzellen noch nicht vollständig geklärt werden. Aus diesem Grund sollte in diesem Teil der Arbeit die Rolle der S1PRs und deren Signalwege auf die COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen analysiert werden, da dieser Zelltyp bei entzündlichen Nierenerkrankungen wie der GN eine zentrale Rolle spielt. In diesem Zusammenhang konnte eine Veröffentlichung von Hirose *et al.* zeigen, dass die COX-2 in glomerulären Mesangiumzellen einer Anti-Thy1.1-induzierten mesangioproliferativen GN und in Nieren von Patienten mit einer aktiven Lupus-Nephritis hoch reguliert ist [181]. Die COX-2 stellt somit ein vielversprechendes Target in der Therapie von entzündlichen Nierenerkrankungen dar.

3.4.1 Wirkung von S1P auf die Protein- und mRNA-Expression der COX-2 in Mesangiumzellen der Ratte

Um einen ersten Überblick über die Wirkung von eS1P auf die Expression der COX-2 in Rattenmesangiumzellen zu erhalten, wurden diese mit steigenden Konzentrationen S1P (0,1-3 µM) für 2 h inkubiert und anschließend die mRNA-Expression der COX-1/2 und die Proteinexpression der COX-2 gemessen.

Wie aus der Abb. 28 hervorgeht, steigt die mRNA-Expression der COX-2 nach einer 16-stündigen Inkubationszeit mit S1P konzentrationsabhängig an. Mit 1 µM S1P ist die mRNA-Expression auf das 3,5-fache und mit 3 µM auf das 6,5-fache der Kontrollwerte angestiegen. Die Behandlung der Zellen mit 0,1 µM S1P wies nur einen sehr geringen und

nicht signifikanten Anstieg der COX-2-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle auf. Die mRNA-Expression der COX-1 blieb unverändert.

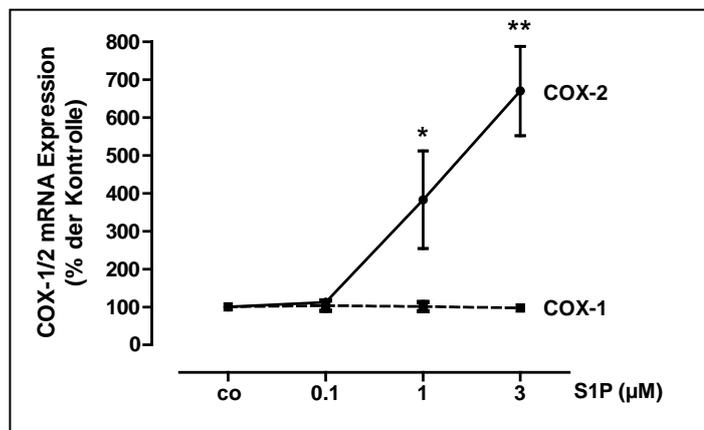


Abb. 28: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die mRNA-Expression der Cyclooxygenase-1/2 (COX-1 und -2) in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen wurden für 2 h entweder mit Lösungsmittel, oder mit unterschiedlichen Konzentrationen S1P inkubiert und geerntet. Die RNA wurde extrahiert und einer quantitativen Real-Time-PCR-Analyse unterzogen. Hierzu wurden spezifische Primer für die Cox-1 und -2 der Ratte verwendet und die Daten mit der gemessenen Konzentration an GAPDH mRNA normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05 und **P < 0.01 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit MeOH behandelten Kontrollwerte angesehen. Die Analysen wurden von Herr Dr. Alexander Koch durchgeführt (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Frankfurt).

Auch der Western Blot in Abb. 29A zeigt, dass eine 16-stündige Inkubation der Rattenmesangiumzellen mit 0,1 μ M, 1 μ M und 3 μ M S1P zu einer signifikanten, gesteigerten Proteinexpression der COX-2 führt. Zusätzlich wurde die Proteinexpression der COX-2 zeitabhängig nach einer 2-, 6-, 16- und 24-stündigen Inkubation mit 1 μ M S1P bestimmt. Aus der Abb. 29B geht hervor, dass die Proteinexpression nach 2 h auf ca. 275 % signifikant anstieg und dann zeitabhängig herunter reguliert wurde. Nach einer 6-stündigen Inkubation lag die Expression noch bei ca. 250 %, nach 16 h bei ca. 150 % und nach 24 h nur noch bei ca. 130 %. Auch die mRNA-Expression der COX-2 war nach 2 h signifikant induziert und stellte sich danach auf das Kontrollniveau ein (Ko (MeOH) = 100 ± 0 ; 2 h = $210 \pm 33,8^*$; 6 h = $102 \pm 5,56$; 16 h = $91,2 \pm 3,81$; 24 h = $89,1 \pm 13,5$; Mittelwerte \pm SEM (n = 4) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit MeOH behandelten Kontrollwerte angesehen).

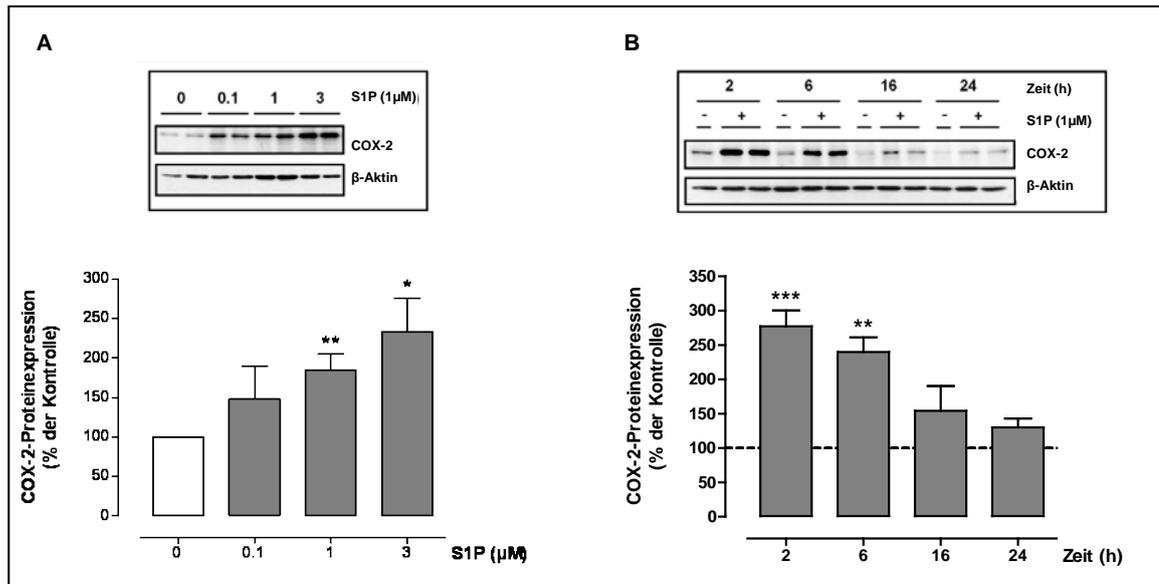


Abb. 29: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.

(A) Ruhende Mesangiumzellen wurden für 2 h entweder mit Lösungsmittel (MeOH, weißer Balken), oder mit unterschiedlichen Konzentrationen S1P (0,1-3 μ M, graue Balken) inkubiert. (B) Ruhende Mesangiumzellen wurden für 2, 6, 16 und 24 h mit 1 μ M S1P inkubiert. Anschließend wurden die Zellproteine wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die COX-2 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β -Aktin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05, **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit MeOH behandelten Kontrollwerte angesehen.

3.4.2 Wirkung von Actinomycin D auf die mRNA-Expression der COX-2 in Rattenmesangiumzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eS1P zu einem Anstieg der COX-2 mRNA- und Proteinexpression führt, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob diese Veränderung auf eine mögliche mRNA-Stabilisierung durch S1P zurückgeführt werden kann. Dafür wurde der aus *Streptomyces antibioticus* isolierte Transkriptioninhibitor Act D verwendet. Das Molekül enthält einen Phenoxazon-Ring, der, besonders in GC-reichen Abschnitten, mit der DNA interkaliert und somit die Transkription (in niedriger Dosierung), aber auch die Replikation (in höherer Dosierung) blockiert.

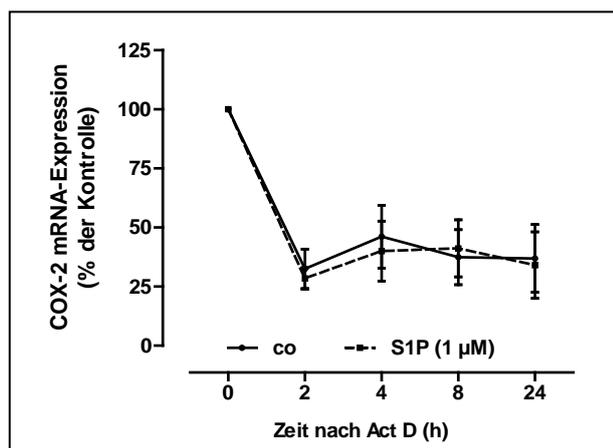


Abb. 30: Wirkung von Actinomycin D (Act D) auf die mRNA-Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit Actinomycin D (5 µg/ml) für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit S1P (1 µM) für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die RNA wurde extrahiert und einer quantitativen Real-Time-PCR-Analyse unterzogen. Hierzu wurden spezifische Primer für die COX-2 der Ratte verwendet und die Daten mit der gemessenen Konzentration an GAPDH mRNA normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle. Die Analysen wurden von Herr Dr. Alexander Koch durchgeführt (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Frankfurt).

Wie aus der Abb. 30 ersichtlich ist, kam es nach ungefähr 2 h zu einem Abbau der COX-2-mRNA-Expression. Dieser Abbau wurde allerdings durch die zusätzliche Stimulation mit 1 µM S1P über eine mögliche S1P vermittelte mRNA-Stabilisierung der COX-2 nicht wieder aufgehoben. Die Behandlung von Act D führte zu einer Inhibierung der durch S1P induzierten Steigerung der COX-2-mRNA aufgrund der Hemmung der *de-novo*-mRNA-Synthese. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Regulation der COX-2-Expression auf transkriptioneller Ebene verläuft.

3.4.3 Wirkung der S1P-Rezeptorantagonisten JTE-013, W146 und VPC-23019 auf die Proteinexpression der COX-2

Um zu evaluieren, welcher S1P-Rezeptorsubtyp für die durch S1P induzierte transkriptionelle Induktion der COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen verantwortlich ist, wurden Versuche mit den S1P-Rezeptorantagonisten W146, JTE-013, sowie VPC-23019 durchgeführt. W146 blockiert den S1P₁-Rezeptor, JTE-013 dagegen selektiv den S1P₂-Rezeptor und VPC-23019 blockiert die S1PRs S1P₁ und S1P₃.

Dabei wurden Rattenmesangiumzellen mit 10 µM des jeweiligen S1P-Rezeptorantagonisten für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 1 µM S1P für weitere 2 h stimuliert. In Folge wurde die Proteinexpression der COX-2 bestimmt.

Die Inkubation von Rattenmesangiumzellen mit S1P führte, wie bereits mehrfach gezeigt, zu einem signifikanten Anstieg der COX-2-Proteinexpression. Wurden die Zellen vor der S1P-Stimulation mit dem S1P₂-Rezeptorantagonisten JTE-013 behandelt, war die Induktion der COX-2 durch S1P antagonisiert, wie in Abb. 31 zu sehen ist.

Die Vorstimulation der Zellen mit W146 und VPC-23019 führte zu keiner antagonisierenden Wirkung. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Expression der COX-2 durch S1P über den S1P₂-Rezeptor vermittelt wird.

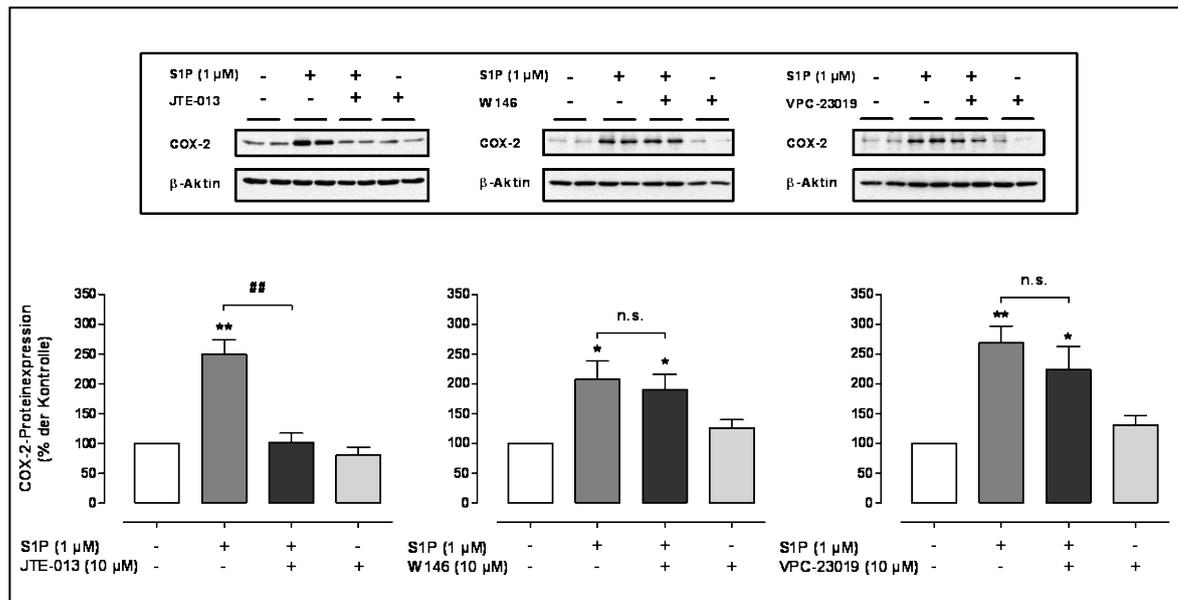


Abb. 31: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptorantagonisten auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen wurden für 1 h mit 10 μ M JTE-013, W146 oder VPC-23019 inkubiert und anschließend mit 1 μ M S1P für weitere 2 h stimuliert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die COX-2 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β -Aktin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=3-4) in % im Vergleich zur Kontrolle. **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit MeOH und ##P < 0.01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit S1P behandelten Kontrollwerte angesehen. n.s. = nicht signifikant

3.4.4 Wirkung von S1P₂-Rezeptor siRNA auf die Proteinexpression der COX-2

Die vorangehenden pharmakologischen Daten lassen vermuten, dass der S1P₂-Rezeptor für die verstärkte COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen verantwortlich sein könnte. Da die Spezifität der verwendeten Antagonisten nicht eindeutig geklärt ist, wurde im nächsten Schritt siRNA gegen den S1P₂-Rezeptor eingesetzt um die S1P₂-

Rezeptorexpression selektiv und effektiv zu inhibieren, damit eine Beteiligung dieses Rezeptorsubtyps stringenter identifiziert werden kann.

In Abb. 32 ist die COX-2-Proteinexpression nach der Transfektion von Rattenmesangiumzellen mit siRNA wie im Methodenteil beschrieben gegen den S1P₂-Rezeptor und anschließender Stimulation mit 1 µM S1P für 2 h zu sehen. Wie aus der Abb. hervorgeht, war die COX-2-Expression auf Proteinebene durch die Verwendung von S1P₂-Rezeptor-siRNA signifikant im Vergleich zur S1P-stimulierten Kontrolle (Mock) inhibiert (Abb. 32). Auch die S1P₂-Rezeptor-mRNA-Expression war im Vergleich zur Kontrolle (Mock) signifikant verringert (Mock = 100 ± 0; siS1P₂ = 27,4 ± 6,92^{***}; Mittelwerte ± SEM (n = 3) in % im Vergleich zur Kontrolle. ***P < 0.001 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit MeOH behandelte Kontrolle angesehen).

Somit konnte der S1P₂-Rezeptorsubtyp als der verantwortliche Rezeptor für die S1P-induzierte COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen identifiziert werden.

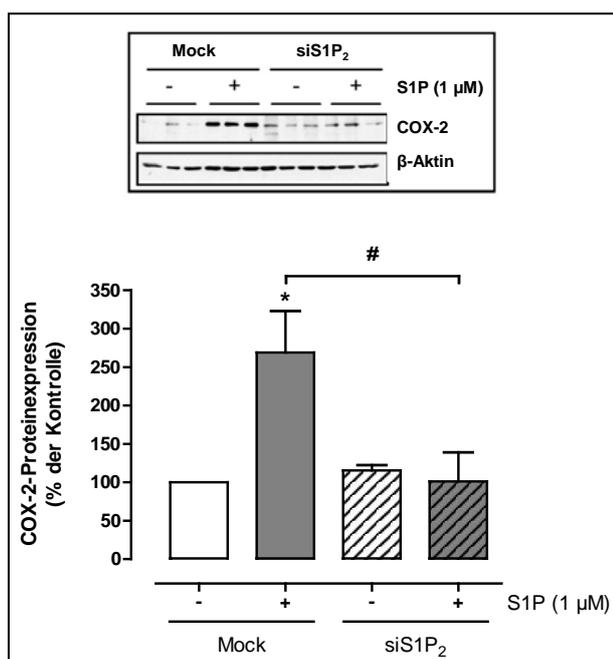


Abb. 32: Wirkung von siRNA gegen den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2 (S1P₂) auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit siRNA gegen S1P₂-Rezeptor nach Herstellerangaben mit dem Cell Line Nucleofector Kit von Lonza für 48 h transfiziert und anschließend mit 1µM S1P für 2 h stimuliert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die COX-2 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β-Aktin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=4) in % im Vergleich zur Kontrolle (Mock). *P < 0.05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit MeOH und [#]P < 0.05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit S1P behandelten Kontrollwerte angesehen.

3.4.5 Wirkung PTX und Y 27632 auf die Proteinexpression der COX-2 in Mesangiumzellen der Ratte

Im nächsten Schritt sollte der nachgeschaltete Signalweg des S1P₂-Rezeptors näher charakterisiert werden. Es ist bekannt, dass S1P wichtige Funktionen extrazellulär durch spezifische Bindung an GPCRs vermittelt. Die Signalweiterleitung erfolgt dann über verschiedene G-Protein-Untereinheiten. In den Abschnitten 3.4.3 und 3.4.4 wurde gezeigt, dass die Expression der COX-2 durch S1P über den S1P₂-Rezeptor vermittelt wird. Der S1P₂-Rezeptor aktiviert die G_{i/0}-, G_q- und G_{12/13}-Signalkaskaden.

Die genauen Signaltransduktionswege für die S1P abhängige COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen sind jedoch noch nicht endgültig geklärt. Um heraus zu finden an welche der genannten Signalwege der S1P₂-Rezeptor koppelt, kamen die Inhibitoren PTX und Y 27632 zum Einsatz. PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung eines Cysteinrestes der G_{α_{i/0}} Untereinheit und stabilisiert die G_α-Untereinheit, die GDP gebunden hat, also in ihrer inaktiven Form. Dadurch wird eine weitere Signalkaskade im Innern der Zelle unterbunden [182]. Der Rho-abhängigen-Kinase (ROCK)-Inhibitor Y 27632 beeinflusst die Signalweiterleitung über G_{12/13} gekoppelte Wege.

Um eine Beteiligung der G_{α_i} Untereinheit bei der Induktion der COX-2-Expression durch S1P zu zeigen, wurden Rattenmesangiumzellen für 2 h mit 100 ng/ml PTX vorinkubiert und anschließend mit 1 μM S1P für weitere 2 h stimuliert. In der Folge wurde die COX-2-Proteinexpression signifikant von ca. 210 % des Kontrollwertes mit S1P behandelt auf ca. 130 % herunter reguliert (Abb. 33A). Diese Ergebnisse zeigen, dass PTX in der Lage ist die COX-2-Expression nahezu vollständig zu unterdrücken, was auf eine Signalübermittlung über die G_{α_i} Untereinheit schließen lässt. Zudem wurde durch die Vorinkubation der Rattenmesangiumzellen mit 10 μM Y 27632 für 2 h und anschließender Stimulation von 1 μM S1P für weitere 2 h die COX-2-Proteinexpression nicht signifikant herunter reguliert und blieb auf dem mit S1P behandelten Kontrollniveau (Abb. 33B). Diesen Ergebnissen zu Folge ist in Rattenmesangiumzellen der G_{i/0}- und nicht der G_{12/13}-gekoppelte Weg in der Signalweiterleitung des S1P₂-Rezeptors beteiligt.

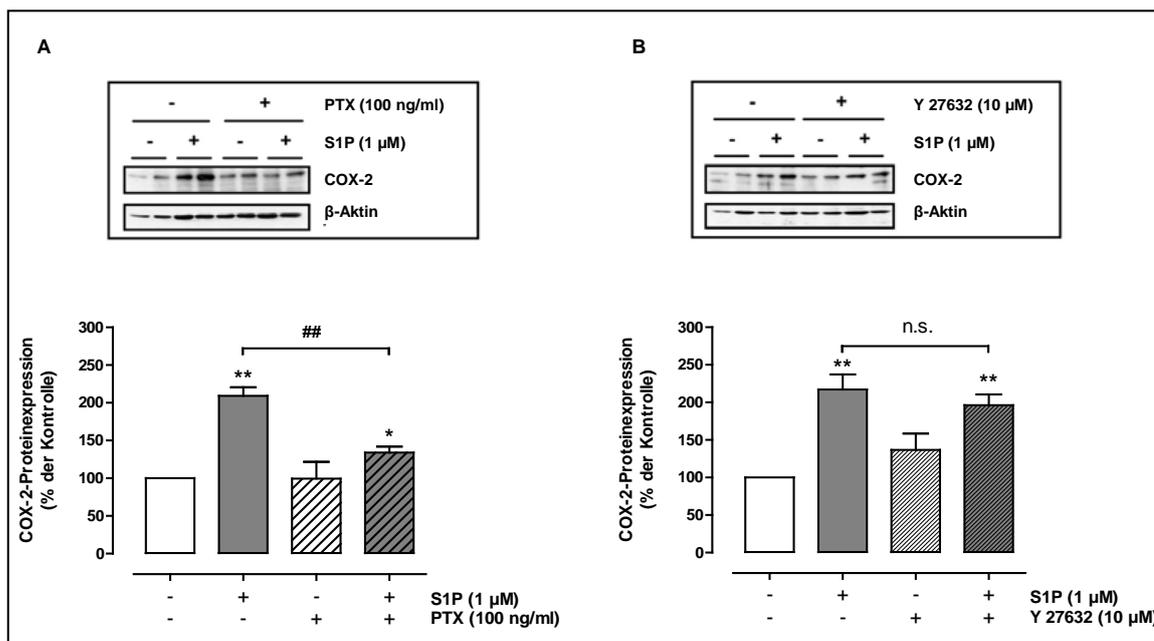


Abb. 33: Wirkung von Pertussistoxin (PTX) und Y 27632 auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen wurden für 2 h mit 100 ng/ml (A) PTX oder 10 µM (B) Y 27632 inkubiert und anschließend mit 1 µM S1P für weitere 2 h stimuliert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die COX-2 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β-Aktin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=3-4) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05 und **P < 0.01 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit MeOH und ##P < 0.01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit S1P behandelten Kontrollwerte angesehen. n.s. = nicht signifikant

3.4.6 Einfluss der MAPK-Inhibitoren PD 98059, U0126 und SB 203580 auf die Proteinexpression der COX-2 in Mesangiumzellen der Ratte

Durch eine $G_{i/o}$ -gekoppelte Signalweiterleitung kommt es *downstream* zu einer Aktivierung der MAPK [183]. Zu den drei wichtigsten MAPK-Subfamilien zählen die p42/p44 MAPK (auch ERK1/2 genannt), die p38 MAPK und die JNK/SAPKs. Um die $G_{i/o}$ -aktivierenden intrazellulären Signalwege näher zu untersuchen, wurden Rattenmesangiumzellen mit S1P und zusätzlich mit den Signalinhibitoren PD 98059, U0126 und SB 203580 inkubiert. PD 98059 und U0126 sind Inhibitoren der klassischen MAPK Kinase (MEK1/2) und unterdrücken die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs. Der Inhibitor SB 203580 blockiert die Isoformen p38α und p38β der p38 MAPK.

Wie bereits beschrieben, aktiviert eine $G_{i/o}$ -gekoppelte Signalweiterleitung die MAPK [179]. In diesem Zusammenhang konnte in dieser Arbeit eine schnelle Aktivierung der

p42/p44 MAPK nach Stimulation mit 1 μ M S1P durch die Phosphorylierung der p42/p44 MAPK beobachtet werden (Abb. 34). Wie aus der Abb. 34 hervorgeht, kam es bereits nach einer 5-minütigen S1P-Stimulation zu einer Phosphorylierung der p42/p44 MAPK, die nach 20 Minuten schnell wieder abnahm. Allerdings kam es nach 60 Minuten zu einem weiteren Anstieg der Phosphorylierung von p42/p44 MAPK. Die totale p44 MAPK-Proteinexpression war durch die S1P-Stimulation nicht beeinflusst.

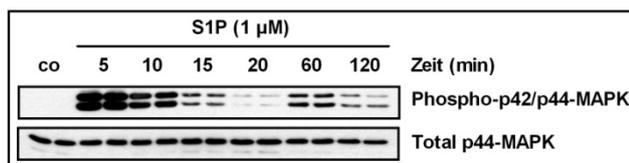


Abb. 34: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die Phospho-p42/p44 Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-(MAPK) und der totalen p44-MAPK Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 1 μ M S1P inkubiert und anschließend wurden Zellproteine wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen Phospho-p42/p44MAPK und als Ladungskontrolle mit Total p44-MAPK analysiert.

Abb. 35 zeigt, dass die beiden MEK1/2 Inhibitoren PD 98059 und U0126 die durch S1P ausgelöste Induktion der COX-2 signifikant blockieren konnten im Vergleich zur S1P stimulierten Kontrolle. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Beteiligung des ERK1/2-Signalwegs in der S1P vermittelten COX-2-Expression. Im Gegensatz dazu wurde die COX-2-Proteinexpression durch den p38 MAPK Inhibitor SB 203580 nicht signifikant reduziert und blieb auf dem mit S1P stimulierten Kontrollniveau. Diese Daten zeigen, dass die p42/p44 MAPK Aktivierung und nicht die p38 MAPK notwendig ist für die S1P-induzierte COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen.

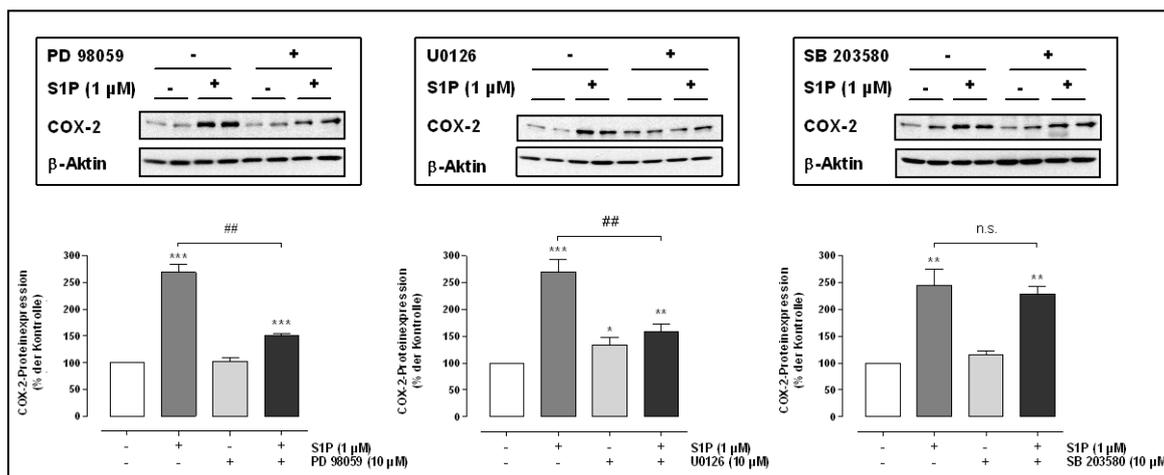


Abb. 35: Wirkung der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK)-Inhibitoren PD 98059, U0126 und SB 203580 auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen wurden für 2 h entweder mit 10 μ M PD 98059, U0126 oder SB 203580 inkubiert und anschließend mit 1 μ M S1P für weitere 2 h stimuliert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die COX-2 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β -Aktin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=3-4) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05, **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit MeOH und ##P < 0.01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die mit S1P behandelten Kontrollwerte angesehen. n.s. = nicht signifikant.

3.4.7 Wirkung von S1P auf die Ang II-induzierte PGE₂-Synthese in Mesangiumzellen der Ratte

Nachdem die Wirkung von eS1P auf die mRNA- und Proteinexpression der COX-2 beschrieben wurde, wurde in einem nächsten Schritt die Aktivität der COX-2 bestimmt, indem die PGE₂-Synthese durch einen PGE₂-ELISA ermittelt wurde. COX katalysieren die Umwandlung von AA zu PGH₂, welches in einer Folgereaktion durch die PGE-Synthase in PGE₂ umgewandelt werden kann. PGE₂ ist in der Niere das Hauptprodukt der Prostaglandinbiosynthese und ist an den meisten physiologischen Funktionen der Niere und im Entzündungsgeschehen involviert. Für diesen Versuch wurden Rattenmesangiumzellen zunächst für 2 h mit 1 μ M S1P stimuliert. Die Messungen ergaben, dass die PGE₂-Konzentration der Überstände nach Inkubation der Rattenmesangiumzellen für 2 h mit 1 μ M S1P im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle um 30 % erhöht waren (Ko = 23,8 \pm 1,41 pg/ml; S1P = 31,7 \pm 1,98 pg/ml; Mittelwerte \pm SEM (n = 6-8); P < 0.05). Jedoch waren die erhaltenen basalen PGE₂-Werte nahe der Detektionsgrenze des PGE₂-ELISA Kits (13,4 pg/ml). Um die PGE₂-Konzentrationen zu

erhöhen, wurde deshalb im Anschluss der S1P-Stimulation für weitere 10 Minuten mit 100 nM Ang II stimuliert. Ang II führt zur Aktivierung der normalerweise in inaktiver Form vorliegenden zytosolischen PLA₂ (cPLA₂), die für die Freisetzung von AA aus der Phospholipidmembran verantwortlich ist. Daraus resultieren gesteigerte Ang II-induzierte PGE₂-Konzentrationen.

Die PGE₂-Konzentration im Überstand der Proben wurden nach Herstellerangaben bestimmt.

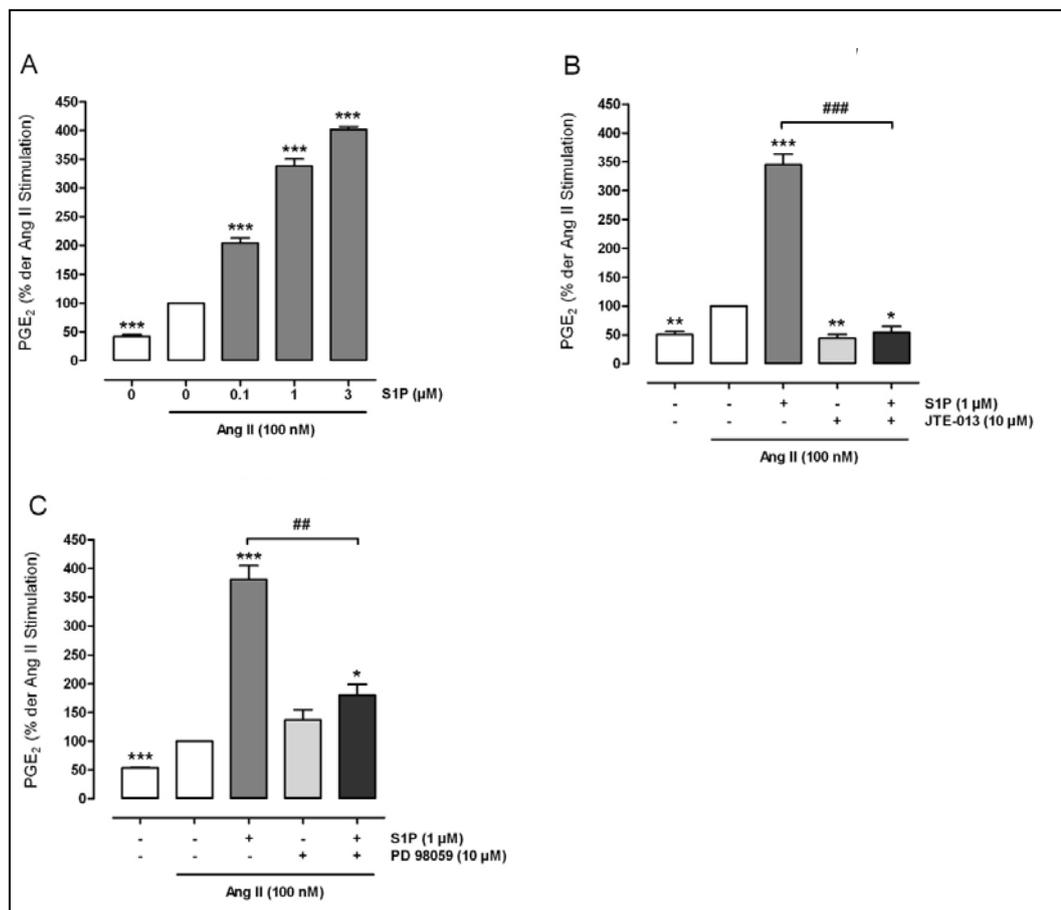


Abb. 36: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die Angiotensin II (Ang II)-induzierte PGE₂-Synthese in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 2 h entweder mit Lösungsmittel (MeOH, weiße Balken), oder mit (A) 0,1-3 μM S1P, (B+C) mit 10 μM JTE und 10 μM PD 98059 für 2 h vorstimuliert und anschließend mit 1 μM S1P inkubiert. Danach wurde für weitere 10 Minuten mit 100 nM Angiotensin II (Ang II) stimuliert. 100 μl Zellkulturüberstände wurden für die PGE₂-Messung verwendet, die nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0,05, **P < 0,01 und ***P < 0,001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit Angiotensin und ##P < 0,01 und ###P < 0,001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit S1P behandelten Kontrollwerte angesehen.

Aus der Abb. 36 wird deutlich, dass die Ang II-induzierte PGE₂-Konzentration der Überstände nach Inkubation der Rattenmesangiumzellen für 2 h mit DMSO und 100 nM Ang II auf das 2,4-fache im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle induziert wurde (Kontrolle = 27,7 ± 1,65 pg/ml; Ang II = 65,7 ± 3,53 pg/ml; Mittelwerte ± SEM (n = 3); P < 0.01). Ebenso wird deutlich, dass eine zusätzliche Stimulation mit 1 µM S1P die Ang II-induzierte PGE₂-Konzentration der Überstände dosisabhängig verstärkt wird. Durch eine Vorinkubation der Mesangiumzellen mit dem S1P₂-Rezeptorantagonisten JTE-013 oder dem MEK1/2 Inhibitor PD 98059 verringerten sich die Ang II-induzierten PGE₂-Konzentrationen signifikant im Vergleich zur S1P behandelten Kontrolle. Diese Daten manifestieren die Beteiligung des S1P₂-Rezeptors und die anschließende Aktivierung der p42/p44 MAPK Kaskade an der S1P-induzierten COX-2-Expression. Allerdings war die Ang II-induzierte PGE₂-Konzentration mit dem S1P₂-Rezeptorantagonisten JTE-013 ohne S1P ebenfalls herab reguliert. Dies deutet womöglich auf eine unspezifische Wirkungsweise von JTE-013 hin.

3.4.8 Wirkung von S1P und IL-1β auf die COX-2- Proteinexpression und PGE₂-Konzentrationen in Mesangiumzellen der Ratte

Neben S1P können auch verschiedene Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren wie IL-1β die COX-2-Expression und Prostaglandinbiosynthese induzieren. Ohama *et al.* konnte 2008 zeigen, dass S1P die Effekte von IL-1β auf die COX-2-Expression in Myofibroblasten der Maus verstärkt [184]. In den folgenden Experimenten wurde analysiert ob S1P die COX-2-Expression und anschließende PGE₂-Synthese über den S1P₂-Rezeptor in Rattenmesangiumzellen auch in Gegenwart des pro-entzündlichen Zytokins IL-1β induziert. Dafür wurden Rattenmesangiumzellen für 2 h mit 1 nM IL-1β und steigenden S1P-Konzentrationen (0,1-3 µM) stimuliert.

Wie aus der Abb. 37A hervorgeht, verstärkt S1P die IL-1β induzierte COX-2-Proteinexpression in Rattenmesangiumzellen dosisabhängig und diese wiederum kann durch den MEK1/2-Inhibitor PD 98059 aufgehoben werden (Abb. 37B).

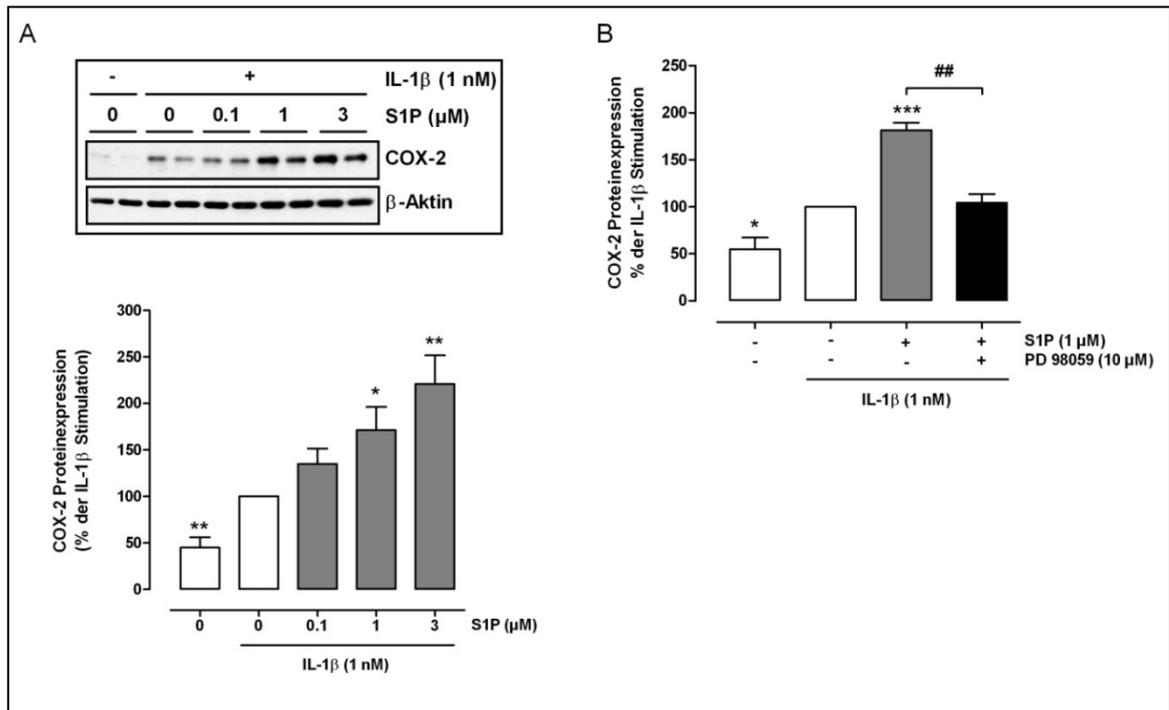


Abb. 37: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Interleukin-1β (IL-1β) auf die Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte.

(A) Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden entweder für 2 h mit 1 nM IL-1β und steigenden S1P-Konzentrationen (0,1-3 μM) inkubiert oder (B) mit 10 μM PD 98059 für 2 h vorstimuliert und anschließend mit 1 nM IL-1β und 1 μM S1P für weitere 2 h stimuliert. Zellproteine wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 30 μg Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die COX-2 analysiert. Als Ladungskontrolle wurde der jeweilige Gehalt von β-Aktin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=3) in % im Vergleich zur IL-1β stimulierten Kontrolle. *P < 0,05, **P < 0,01 und ***P < 0,001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit IL-1β und ##P < 0,01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die zusätzlich mit S1P behandelten Kontrollwerte angesehen.

In einem nächsten Schritt wurde die PGE₂-Synthese wie unter 3.4.7 durch einen PGE₂-ELISA ermittelt. Dafür wurden Rattenmesangiumzellen zunächst für 2 h mit 1 nM IL-1β und steigenden S1P-Konzentrationen inkubiert. Die folgende Abb. zeigt, dass eine Behandlung der Zellen mit 1 nM IL-1β eine 20-fache Induktion der PGE₂-Konzentration bewirkt (Ko = 25,3 ± 0,24 pg/ml; IL-1β = 525 ± 51,2 pg/ml; Mittelwerte ± SEM (n = 3); P < 0,01). Eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit steigenden S1P Konzentrationen von 0,1-3 μM erhöht die PGE₂-Konzentrationen signifikant im Vergleich zur mit IL-1β stimulierten Kontrolle. Durch den MEK1/2-Inhibitor PD 98059, der für 2 h vor der IL-1β (1 nM) und S1P (1 μM) Kostimulation eingesetzt wurde, reduzierte sich signifikant die PGE₂-Konzentration im Vergleich zur mit S1P stimulierten Kontrolle.

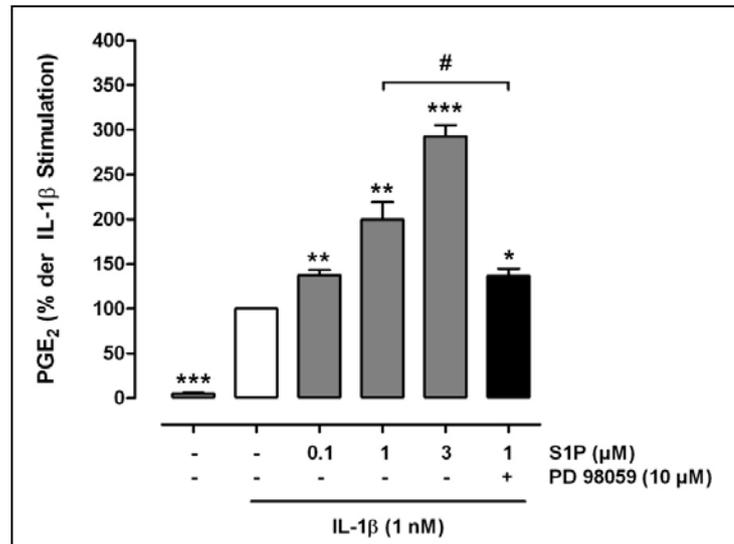


Abb. 38: Wirkung von Interleukin-1 β (IL-1 β) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die PGE₂-Synthese in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen wurden entweder für 2 h mit 1 nM IL-1 β und steigenden S1P-Konzentrationen (0,1-3 μ M) inkubiert oder mit 10 μ M PD 98059 für 2 h vorstimuliert und anschließend mit 1 nM IL-1 β und 1 μ M S1P für weitere 2 h kostimuliert. 100 μ l Zellkulturüberstände wurden für die PGE₂-Messung verwendet, die nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05, **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die mit IL-1 β und #P < 0.05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die zusätzlich mit S1P behandelten Kontrollwerte angesehen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eS1P in Gegenwart des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β die COX-2-Proteinexpression und PGE₂-Synthese in Rattenmesangiumzellen verstärkt. Der dafür verwendete Signalweg verläuft über den G_i gekoppelten S1P₂-Rezeptor und eine Aktivierung der p42/p44 MAPK (Abb. 39).

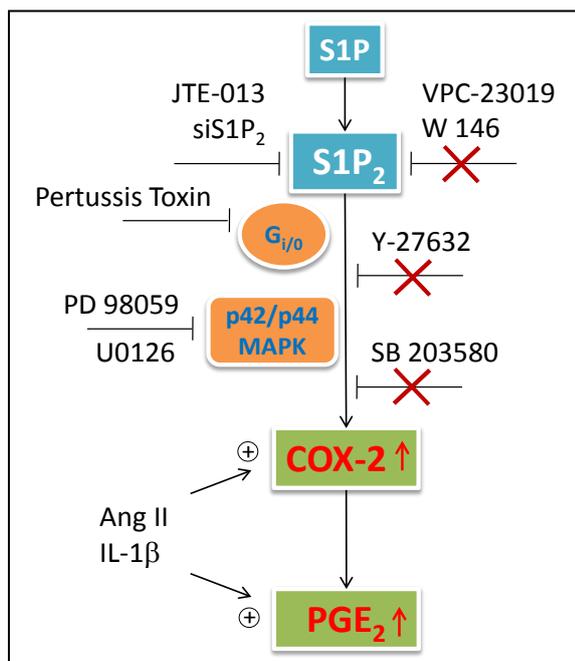


Abb. 39: Zusammenfassendes Schema des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-2 (S1P₂)-vermittelten Signalwegs der Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-induzierten Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Expression und PGE₂-Synthese in Mesangiumzellen der Ratte.

Extrazelluläres S1P induziert über den G_i-gekoppelten S1P₂-Rezeptor die COX-2-Expression und PGE₂-Synthese. Der Signalweg verläuft über die Aktivierung der p42/p44 Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK). Durch die spezifischen *extracellular signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2)-Inhibitoren U0126 und PD 98059 sowie durch den S1P₂-Rezeptorantagonisten JTE-013, siRNA gegen den S1P₂-Rezeptor (siS1P₂) und durch Pertussis Toxin (PTX) wurde die COX-2 Proteinexpression herunter reguliert. Die S1P-Rezeptorantagonisten VPC-23019 und W146 sowie der Rho-abhängige Kinase Inhibitor Y 27632 und der p38-MAPK-Inhibitor SB 203580 haben die COX-2-Expression nicht beeinflusst. Die basalen PGE₂-Konzentrationen waren nach der Stimulation mit S1P erhöht, die durch die zusätzliche Verwendung von COX-2-induzierendem Angiotensin II (Ang II) verstärkt werden konnten. Außerdem resultierte die Behandlung von Rattenmesangiumzellen mit S1P in Gegenwart des pro-entzündlichen Zytokins Interleukin-1β (IL-1β) in einer Steigerung der COX-2-Expression und PGE₂-Biosynthese.

3.5 Wirkung von intrazellulärem S1P auf die COX-2-Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte und der Maus

S1P wird in erster Linie intrazellulär mit Hilfe der SKs durch die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P gebildet [25] und wirkt dort als klassischer *second messenger*.

In diesem Teil der Arbeit sollte die Wirkung von iS1P auf die COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen charakterisiert werden. Dazu wurden die Zellen für 16 h mit steigenden Konzentrationen der SK-1 Inhibitoren SKI II und DMS inkubiert, welche die Umwandlung von Sphingosin zu S1P blockieren.

Aus der Abb. 40 wird deutlich, dass die Expression der COX-2 in Rattenmesangiumzellen durch die SK-1-Inhibitoren SKI II und DMS signifikant und konzentrationsabhängig anstiegen im Vergleich zu den Kontrollwerten.

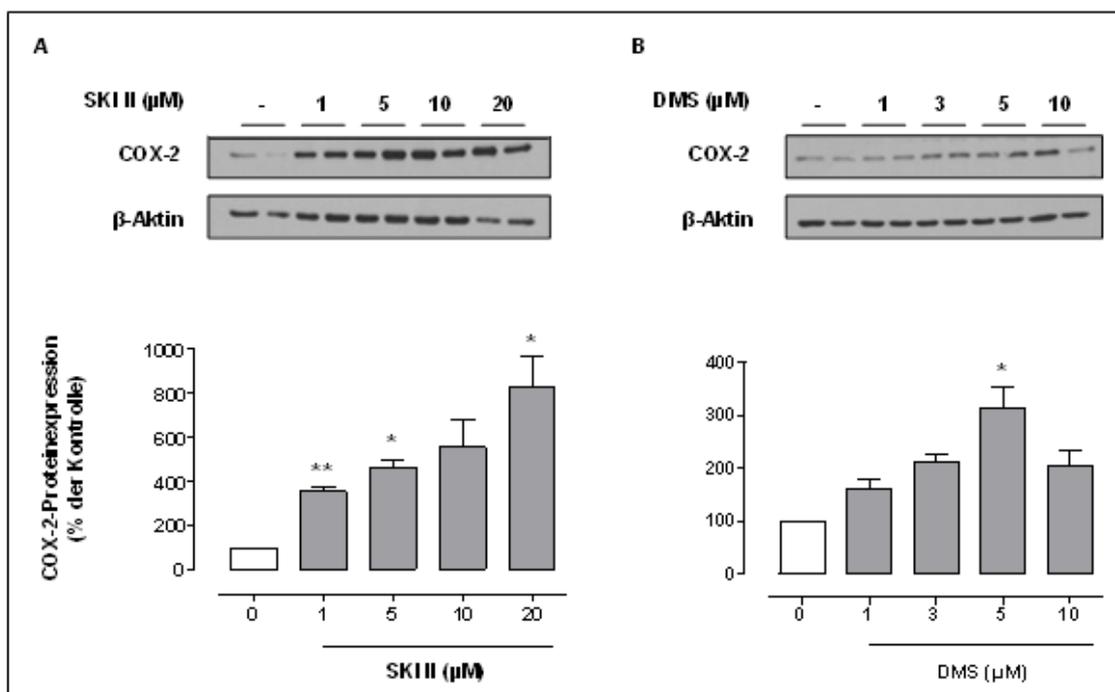


Abb. 40: Wirkung der Sphingosinkinaseinhibitoren 2-(p-Hydroxyanilino)-4-(p-Chlorophenyl)-thiazol (SKI II) und Dimethylsphingosin (DMS) auf die Proteinexpression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte wurden für 16 h mit (A) dem Sphingosinkinase-1 (SK-1)-Inhibitor SKI II (1-20 μM) oder mit (B) DMS (1-10 μM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 30 μg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen COX-2 und β-Aktin als Ladekontrolle analysiert. Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten sowie Mittelwerte ± SEM (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle. *P < 0.05 und **P < 0.01 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

Um den pharmakologischen Effekt der SK-1 Inhibitoren zu überprüfen, wurden Mausmesangiumzellen, die aus SK-1^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, verwendet und mit Zellen aus C57BL/6 WT-Mäusen verglichen. Für diesen Versuch wurden die Zellen 16 h serumfrei gesetzt und anschließend die COX-2-Proteinexpression bestimmt. Wie aus Abb. 41 hervorgeht, ist die COX-2-Proteinexpression in SK-1^{-/-}-Mesangiumzellen im Vergleich zu den WT-Zellen signifikant erhöht.

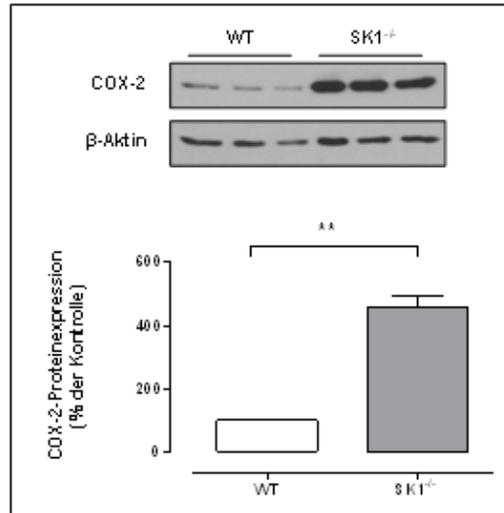


Abb. 41: Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Proteinexpression in Wildtyp (WT)- und SK-1^{-/-}-Mesangiumzellen der Maus.

Ruhende Mesangiumzellen der Maus (WT und SK-1^{-/-}) wurden für 16 h serumfrei gesetzt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 30 µg Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen COX-2 und β-Aktin als Ladekontrolle analysiert. Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten sowie Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3) in % im Vergleich zu WT-Kontrollzellen. **P < 0.01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte der WT-Zellen angesehen.

In einem nächsten Schritt wurde die Aktivität der COX-2 in Maus-WT- und SK-1^{-/-}-Zellen bestimmt, indem die PGE₂-Synthese durch einen PGE₂-ELISA ermittelt wurde.

Die Abb. 42 zeigt eine signifikante Steigerung der PGE₂-Konzentration der Überstände nach Inkubation der SK-1^{-/-}-Mausmesangiumzellen im Vergleich zu den WT-Mausmesangiumzellen.

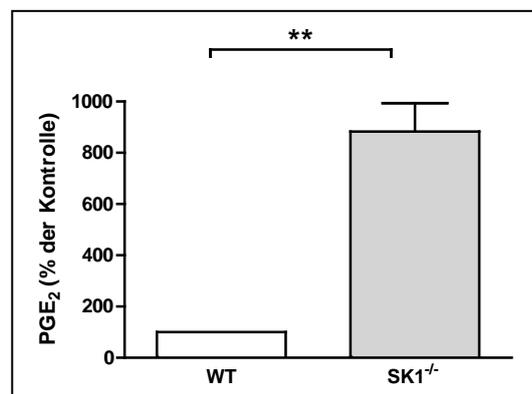


Abb. 42: PGE₂-Synthese in Wildtyp (WT)- und SK-1^{-/-}-Mesangiumzellen der Maus.

100 µl Zellkulturüberstände wurden für die PGE₂-Messung verwendet, die nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3) in % im Vergleich zur Kontrolle. **P < 0.001 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die WT-Kontrollwerte angesehen.

4 Diskussion

Sphingolipide wie Ceramid, Sphingosin und S1P werden in jüngster Zeit neben ihrer Funktion als reine Membranbestandteile zunehmend als bioaktive Signalmoleküle verstanden. Im Fokus der derzeitigen Forschung steht S1P, da es vielfältige physiologische und pathophysiologische Prozesse wie die Organisation des Zytoskelettes, die Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes sowie Proliferation, Migration, Adhäsion und Apoptose reguliert [70, 185]. Zudem wird eine Veränderung des S1P-Metabolismus mit einer Vielzahl bedeutsamer Erkrankungen in Verbindung gebracht [172-173].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene intra- und extrazelluläre Wirkmechanismen von S1P auf den Sphingolipid- und Eicosanoidmetabolismus in Mesangiumzellen untersucht um wertvolle und neue Erkenntnisse für die zukünftige Behandlung von fibrotischen und entzündlichen Nierenerkrankungen zu erhalten. So wurde in einem ersten Teil der Einfluss von TZDs als Agonisten von $\text{PPAR}\gamma$ auf den intrazellulären Sphingolipidstoffwechsel und die Rolle von intrazellulär generiertem S1P für die Synthese von pro-fibrotischem CTGF untersucht um weitere Erklärungsansätze für die bekannten reno-protectiven Effekte von TZDs zu erhalten. Zudem wurde im Hinblick auf die Entstehung von Nierenerkrankungen der durch die $\text{PPAR}\gamma$ -Agonisten TRO und RSG aktivierte S1P-Rezeptorsubtyp in Rattenmesangiumzellen analysiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die funktionelle Rolle von extra- und intrazellulärem S1P auf die Expression und Aktivität der pro-inflammatorischen COX-2 und die daran beteiligten Signalwege in renalen Mesangiumzellen untersucht.

4.1 Wirkung von TZDs auf den Sphingolipidmetabolismus in Mesangiumzellen

TZDs können seit einiger Zeit neben ihrem Einsatz als antidiabetische Medikamente auch als potentielle Therapeutika zur Behandlung von chronischen, sowohl diabetisch als auch nicht-diabetisch induzierten Nierenerkrankungen und fibrotischen Prozessen zunehmend in Betracht gezogen werden [94]. Die gemeinsame Endstrecke zahlreicher chronischer Nierenerkrankungen ist die Nierenfibrose, die im Endstadium zum völligen Verlust der Organfunktion führt und mit einer Zunahme von Morbidität und Mortalität einhergeht. Allerdings stehen bis heute keine effektiven therapeutischen Maßnahmen zur Verhinderung einer Nierenfibrose zur Verfügung, da die zugrunde liegenden Mechanismen

der renalen Fibrogenese unzureichend aufgeklärt sind. Zwar existieren verschiedene antifibrotische Ansatzpunkte, die aber noch nicht erfolgreich in der Therapie eingesetzt werden können. Daher ist es wichtig neue Strategien zu entwickeln, die vor Nierenerkrankungen wie der DN schützen oder deren weiteren Verlauf verhindern. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zusätzliche Erklärungsansätze der bekannten anti-inflammatorisch und anti-fibrotisch agierenden synthetischen PPAR γ -Liganden TRO und RSG in Zusammenhang mit der Synthese von iS1P durch die Enzyme des Sphingolipidstoffwechsel heraus zu finden. Von den bisher drei identifizierten PPAR-Subtypen, PPAR α , β und γ , ist PPAR γ der am besten untersuchte Rezeptor. Er wird durch die synthetisch erzeugten PPAR-Liganden TRO, RSG, PIO und Ciglitazon aktiviert, die alle zur Gruppe der TZDs gehören und ursprünglich zur Therapie des Diabetes Mellitus Typ 2 entwickelt wurden. Jedoch besitzen TZDs neben ihrer Wirkung als Antidiabetika auch zahlreiche Nebenwirkungen. TRO wurde als erster Vertreter der TZDs aufgrund von schwerer Hepatotoxizität mit letalem Ausgang schnell wieder vom Markt genommen [90]. RSG steht unter dem Verdacht das Herzinfaktrisiko zu erhöhen und ist in Deutschland seit dem Jahr 2010 nicht mehr zur Therapieanwendung zugelassen. Weitere häufige unerwünschte Nebenwirkungen sind Ödeme, Blutarmut, vermehrte Knochenbrüche bei Frauen sowie Gewichtszunahme und Erhöhung der Cholesterinwerte im Blut. Allerdings konnte die Arbeitsgruppe von Spiegelman [91] trotz aller bekannten Nachteile von TZDs neue Möglichkeiten zur Behandlung von Diabetes mit PPAR γ -Liganden zeigen, indem diese geringfügig in ihrer Struktur geändert wurden, so dass das Risiko an kardiovaskulären Nebeneffekten zu erkranken unterbunden wurde [92-93]. Außerdem wurde durch zahlreiche Studien deutlich, dass TZDs nicht nur protektive Effekte auf Nierenleiden wie der Glomerulosklerose und der DN, sondern auch auf nicht-diabetische, chronische Nierenerkrankungen wie der Fibrose ausüben [186].

In diesem Zusammenhang konnte Ren *et al.* (2009) weitere Aspekte hinzufügen und zeigen, dass TGF- β nicht nur die Expression von CTGF, sondern auch die Aktivität der SK-1 in humanen Podozyten induzieren kann. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Überexpression der SK-1 und eine damit vermehrte iS1P-Produktion die CTGF-Expression herunter regulierte, wohingegen die pharmakologische Inhibierung oder der Abbau der SK-1 zu einer erhöhten CTGF-Expression führte [67]. Aus diesen Daten geht hervor, dass die SK-1 während einer Fibroseentstehung durch die Hemmung der CTGF-

Expression wie eine Bremse wirken kann. Somit könnte eine pharmakotherapeutische Beeinflussung der SK-1 Fibroseprozesse in chronischen Nierenleiden unterdrücken [187]. In Übereinstimmung mit den Daten von Ren *et al.* [67], zeigen unsere Daten, dass eine TGF- β induzierte Expression des pro-fibrotischen Bindegewebswachstumsfaktors CTGF auch in Mesangiumzellen der Ratte durch eine pharmakologische Inhibierung der SK-1 mit dem Inhibitor SKI II erhöht werden kann. Diese Daten untermauern die protektive Rolle der SK-1 auch in glomerulären Mesangiumzellen. Aufgrund der Tatsache, dass bei verschiedenen Fibrosen oder Fibrose-Modellen eine erhöhte CTGF-Konzentration gefunden wurde [188-189] und TGF- β der bedeutendste Induktor des CTGF ist [190], zählen CTGF und TGF- β zu attraktiven therapeutischen Ansatzpunkten zur Behandlung von fibrotischen Erkrankungen [191]. Isshiki *et al.* (2000) und Ma *et al.* (2001) konnten zeigen, dass PPAR γ -Agonisten direkt die glomeruläre TGF- β Expression herunter regulieren und auf diese Weise vor nicht-diabetischer Fibrose schützen können [192-193]. In diesem Zusammenhang konnte im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PPAR γ -Agonisten TRO und RSG in glomerulären Mesangiumzellen den intrazellulären Sphingolipidmetabolismus beeinflussen und so vor Fibrose schützen können. Die Behandlung der Zellen mit den verwendeten TZDs führte zu einem Anstieg der mRNA- und Proteinexpression der SK-1. Ebenso konnte eine gesteigerte Aktivität der SK-1 gemessen werden. Diese Effekte wiederum resultierten in erhöhten, iS1P-Konzentrationen und verringerten CTGF-Konzentrationen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der Ratten-Promotor der SK-1 durch TZDs aktivierbar ist und dass mindestens ein PPRE innerhalb der Promotorsequenz diese Aktivierung bewirkt. Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente wurden durch *in vivo* Experimente mit isolierten Glomeruli, die aus mit TZDs behandelten Mäusen isoliert wurden, bestätigt. Auch hier konnte eine erhöhte mRNA-Expression und eine gesteigerte Proteinexpression der SK-1 gemessen werden. Die CTGF-Proteinexpression war nach Behandlung der Mäuse mit TRO und RSG *in vivo* verringert. Diese Daten weisen darauf hin, dass die anti-fibrotischen Effekte von TZDs in Mesangiumzellen durch eine Aktivierung der SK-1 und anschließender Reduktion der CTGF-Expression hervorgerufen werden. Zudem festigen die gewonnen Ergebnisse bereits publizierte Erkenntnisse, dass PPAR γ -Agonisten neben ihrer Funktion als Insulin-Sensitizer auch als interessante therapeutische Option zur Behandlung von entzündlichen Nierenerkrankungen dienen können.

Wie bereits erwähnt, konnte in dieser Arbeit eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression der SK-1 in renalen Mesangiumzellen der Ratte gemessen werden. Auch konnten Kadegowda *et al.* durch die Behandlung von Mäusen mit der konjugierten Linolsäure *trans*-10, *cis*-12 im Brustgewebe von laktierenden Mäusen eine erhöhte mRNA-Expression der SK-1 messen [194]. Da die vermehrte Transkriptionsrate für eine transkriptionelle Regulierung des Enzyms spricht, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Promotor der Ratten SK-1 untersucht. Der Promotor der humanen SK-1 wurde erstmals 2003 von Nakade *et al.* [195] aus der Leukämiezelllinie MEG-O1 kloniert. Für die Promotorstudien der Ratten SK-1 wurden verschieden lange Fragmente (4009 bp, 2415 bp und 822 bp) des wildtypischen Promotors untersucht. Alle Fragmente zeigten nach der Inkubation mit TRO oder RSG eine gesteigerte Aktivität. Um den Promotor bezüglich der dafür verantwortlichen Transkriptionsfaktoren genauer zu analysieren, konnten durch Sequenzanalysen sieben putative PPREs innerhalb des SK-1 Promotors ermittelt werden. PPREs sind typischerweise Sequenzen, in denen jeweils zwei spezifische Hexamere durch 1 bis 2 beliebige Nukleotide voneinander getrennt sind (5'-AGGTCA N(N) AGGTCA-3') [102]. Durch eine Punktmutation des PPRE 7 im kleinsten Promotorkonstrukt (822 bp) konnte der Promotor nicht mehr durch die PPAR γ -Agonisten aktiviert werden. Diese Daten bestätigen, dass das PPRE 7 funktionell aktiv ist. Jedoch wies eine PPRE 7 Punktmutante des größten Promotorkonstruktes (4009 bp) noch eine geringe Aktivitätssteigerung nach Behandlung der Zellen mit TRO oder RSG auf. Der verminderte Anstieg der Aktivität im 4009 bp-langen Fragment lässt vermuten, dass mindestens noch ein funktionelles PPRE in diesem Konstrukt vorhanden sein muss. Mit Hilfe eines EMSA konnte die Funktionalität und Spezifität des PPRE 7 im Promotor der rSK-1 durch TZDs bestätigt werden. Dabei konnte eine Ausbildung von DNA-Protein-Komplexen nach einer Inkubation von TRO oder RSG behandelten Kernextrakten mit einem DIG-markierten PPRE 7 Motiv beobachtet werden. Ein 20-facher Überschuss von nicht DIG-markiertem PPRE 7 Oligonukleotid als Kompetitor führte zu einem Verschwinden der DNA-Protein-Bande des DIG-markierten PPRE 7 Oligonukleotids. Dies zeigt die spezifische Bindung der markierten Sonde. Im Gegensatz dazu bildeten DIG-markierte Oligonukleotide, die die mutierte Sequenz von PPRE 7 (Δ PPRE 7) enthielten, mit TZDs behandelten Zellen keine DNA-Protein-Komplexe aus. Aus diesen Daten geht hervor, dass das PPRE 7 funktionell aktiv und spezifisch ist für eine Aktivierung des rSK-1 Promotors mit TZDs. Um sicher zu

stellen, dass PPAR γ an das PPRE 7 bindet, sind in zukünftigen Experimenten *Supershift*-Analysen mit einem spezifischen Antikörper gegen PPAR γ nötig.

Die gesteigerte Aktivität der SK-1 resultierte wiederum in erhöhten iS1P-Konzentrationen. Die Konzentrationen von C16-Ceramid und Sphingosin waren dagegen nicht beeinflusst. Da die zellulären S1P-Spiegel in einer Gegenreaktion auch durch abbauende Enzyme bestimmt werden können, wurde zusätzlich die Expression der S1P-Lyase und der S1P-Phosphatasen in renalen Mesangiumzellen untersucht. Die S1P-Lyase, deren Aktivierung zu einem irreversiblen Abbau von S1P führt, war in ihrer mRNA-Expression nicht reguliert. Keine Änderung der mRNA-Spiegel wurden auch für die Phosphatasen SPP-1 und SPP-2 detektiert. Somit konnte die Beeinflussung der S1P-Konzentrationen aufgrund einer Änderung der Expression der S1P-abbauenden Enzyme zumindest auf mRNA-Ebene ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde zeigen, dass eine Erhöhung der S1P-Konzentration im Wesentlichen durch die SK-1 bestimmt wird und nicht durch eine Änderung der Expression der S1P-abbauenden Enzyme [196].

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Effekten von TZDs im Sphingolipidstoffwechsel um von PPAR γ abhängige Effekte handelt, wurden Wettbewerbsversuche mit dem PPAR γ -Antagonisten GW-9662 durchgeführt, der durch kovalente Bindung PPAR γ irreversibel blockiert. Im Falle einer von PPAR γ abhängigen Regulation der SK-1 sollten die beobachteten Anstiege der SK-1-mRNA-Expression sowie der SK-1-Aktivität durch den Inhibitor aufgehoben werden. Hätten TRO und RSG auch von PPAR γ unabhängige Wirkungen auf die Expression der SK-1, wären trotz des Einsatzes von GW-9662 weiterhin Anstiege der mRNA-Expression sowie der Aktivität möglich. Die Steigerungen der beschriebenen Effekte wurden durch eine Vorinkubation mit GW-9662 deutlich unterbunden und deuten daher hin, dass es sich um von PPAR γ abhängige Effekte handelt. Interessanterweise war GW-9662 auch in der Lage die basale Expression der SK-1 mRNA und die SK-1-Aktivität ohne den Einsatz von TZDs zu verringern. Um auszuschließen, dass freie Fettsäuren in der Abwesenheit von TZDs PPAR γ teilweise aktiviert haben könnten, wurden in unserer Arbeitsgruppe Versuche mit Mesangiumzellen in DMEM-Medium ohne Serum und fettsäurefreiem BSA durchgeführt. Die Experimente haben gezeigt, dass auch andere Lipidmediatoren in der Lage sind die Aktivität von PPARs und darauffolgend die Expression der SK-1 zu verändern. Um die Effekte von GW-9662 weiter zu untersuchen, wurde zudem mit Aktivkohle behandeltes Serum im Medium verwendet. Aus den Daten ging hervor, dass der inhibitorische Effekt von GW-9662 unter basalen

Bedingungen abgeschwächt wurde [196]. Diese Ergebnisse deuten auf mögliche weitere Wirkmechanismen von GW-9662 hin, die unabhängig von PPAR γ sein könnten. Außerdem wäre es möglich, dass auch andere durch Aktivkohle eliminierte Lipidmediatoren einen Einfluss auf die SK-1-Expression haben könnten. Um jedoch weitere Aussagen über den Wirkmechanismus von GW-9662 machen zu können, sind zusätzliche Analysen notwendig.

Auch wurden in dieser Arbeit mit 10-20 μ M TRO und 20-50 μ M RSG TZD-Konzentrationen verwendet, die weit höher als die EC₅₀-Werte zur PPAR γ -Aktivierung sind (EC₅₀-Werte zur PPAR γ -Aktivierung in μ M: RSG 0,060 \pm 0,004; TRO 0,69 \pm 0,08) [197, 198]. Die in meiner Arbeit verwendeten TZD-Konzentrationen werden jedoch auch häufig in *in vitro* Studien verwendet [197-201] und sind auch therapeutisch *in vivo* interessant, wenn man die *area under the curve* (AUC) einkalkuliert. Der AUC-Wert berücksichtigt die Expositions-Dauer und -Konzentration einer Substanz im Körper, woraus abgeleitet wird, dass eine geringe Konzentration bei Langzeit-Inkubationen so effektiv sein kann wie eine hohe Konzentration bei Kurzzeit-Inkubationen. So kann beispielsweise der AUC-Wert für TRO eine Serum-Konzentration bis zu 55 μ M erreichen [197] und liegt damit in dem in dieser Arbeit gewählten Konzentrationsbereich von 10 bis 20 μ M. Zudem muss auch beachtet werden, dass TZDs möglicherweise intrazelluläre Organellen als Ziel haben, wodurch es zur cytosolischen Akkumulation der TZDs und somit wiederum zu höheren Konzentrationen kommen könnte [197]. Auch ist nicht geklärt wieviel von den jeweils eingesetzten TZD-Konzentrationen *in vitro* tatsächlich an den PPARs binden und nicht vorher durch freie Fettsäuren oder BSA im Medium abgefangen werden.

Funktionell zeigen die in diesem Teil der Arbeit beschriebenen Daten, dass eine Aktivierung der SK-1 durch TZDs und eine damit verbundene gesteigerte iS1P-Produktion mit einer verringerten CTGF-Expression einhergeht. In diesem Zusammenhang konnte Kawai *et al.* vor kurzem zeigen, dass TZDs direkt über die TGF- β /Smad Signalkaskade interagieren [202], was wiederum mit einer verringerten CTGF-Expression einhergeht [203]. Anhand der veröffentlichten Daten über die Interaktion von TZDs mit dem TGF- β /Smad-Signalweg wäre zu erwarten gewesen, dass durch einen TGF- β neutralisierenden Antikörper die verringerte CTGF-Expression durch TZDs aufgehoben werden könnten. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr deutet es

darauf hin, dass die verminderte Expression von CTGF auf eine gesteigerte Aktivität der SK-1 und vermehrte iS1P-Konzentrationen zurückzuführen sind, da durch die parallele Stimulation mit dem SK-1 Inhibitor SKI II die verringerte CTGF-Expression durch TRO und RSG wieder aufgehoben werden konnte. Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente wurden durch *in vivo* Experimente mit isolierten Glomeruli, aus mit TZDs behandelten Mäusen, bestätigt. Auch hier konnte eine erhöhte mRNA-Expression und eine gesteigerte Proteinexpression der SK-1 gemessen werden. Die CTGF-Proteinexpression war nach Behandlung der Mäuse mit TRO und RSG *in vivo* verringert.

Neben seiner intrazellulären Wirkung vermittelt auch eS1P durch die spezifische Bindung an fünf verschiedene G-Protein gekoppelte S1PRs (S1P₁₋₅) wichtige Funktionen. Es wurde gezeigt, dass eS1P die TGF- β vermittelte CTGF-Expression über eine Kreuzreaktion der Smad-Signalkaskade aktiviert [67, 204]. Zudem fanden Xin *et al.* (2004) durch die Verwendung des S1P₃-Rezeptorantagonisten Suramin heraus, dass der S1P₃-Rezeptor in der Smad-Signalkaskade involviert und für die gesteigerte CTGF-Expression in Mesangiumzellen verantwortlich sein könnte [204]. In diesem Zusammenhang bleibt zukünftig zu klären, ob TZDs eS1P-Konzentrationen und S1PR-Expressionen erhöhen. Aus technischen Gründen war es in dieser Arbeit jedoch nicht möglich S1P im Überstand über LC-MS/MS Analysen zu detektieren. Jedoch konnte unsere Arbeitsgruppe eine gesteigerte mRNA-Expression des S1P₁-Rezeptors nach Inkubation von Rattenmesangiumzellen mit TRO oder RSG detektieren. Im Gegensatz dazu war die mRNA-Expression des S1P₃-Rezeptors, der in Betracht gezogen wird die CTGF-Expression über eS1P zu induzieren, im Vergleich zur Kontrolle unverändert [196]. Deshalb wird für das in dieser Arbeit verwendete Zellmodell ein extrazellulärer Effekt von S1P auf die CTGF-Expression nach einer Behandlung mit TZDs ausgeschlossen. In zukünftigen Versuchen bleibt zu klären, ob TZDs die Aktivität der SK-1 und die S1P-Konzentrationen auch unter diabetischen Umständen verändern können um die Expression von CTGF zu reduzieren. In diesem Zusammenhang konnte Wang *et al.* 2005 zeigen [205], dass unter hohen Glukose Bedingungen die Aktivität der SK-1 verstärkt ist. Die Autoren schlossen daraus, dass im Falle einer diabetischen Vaskulo- und Nephropathie die SK-1 eine wichtige Rolle spielt, ohne jedoch zu klären, ob die SK-1 positive Effekte auf eine DN ausüben und als eine Art Schutz gegen das Fortschreiten von Krankheiten fungieren kann. In einem durch STZ induzierten Diabetes-Mausmodell konnte Geoffroy *et al.* (2005) [206] zeigen, dass die SK-1 Aktivität und S1P-Konzentrationen in isolierten

Glomeruli nach einer 4-tägigen STZ-Behandlung hochreguliert waren. Ausgehend von diesen Daten postuliert diese Gruppe eine Beteiligung von Sphingolipidmetaboliten während der Frühphase einer DN [207]. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte eine Steigerung der SK-1-Expression im Krankheitsmodell der durch STZ induzierten DN beobachten und dass die SK-1 protektive Effekte während Fibroseprozessen ausüben kann. Zudem haben Mäuse mit genetischer Defizienz an der SK-1 schwerwiegendere Nierenerkrankungen gezeigt. Die Beeinflussung des SK-1/S1P-Signalwegs durch PPAR γ -Agonisten zeigt einen weiteren Erklärungsansatz der bekannten anti-fibrotischen Effekte von TZDs und könnte eine neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung einer renalen Fibrose in Folge von chronischen Nierenerkrankungen sein.

Bis heute sind die intrazellulären Wirkorte von S1P nur unzureichend charakterisiert und es ist nicht bekannt wie iS1P die CTGF-Expression reguliert. 1994 konnte Ghosh *et al.* zeigen [63], dass iS1P Ca^{2+} aus Thapsigarin-sensitiven Speichern mobilisiert. Erst seit 2009 konnten direkte intrazelluläre Angriffspunkte von S1P identifiziert werden und umfassen bisher die Ubiquitin-Ligase TRAF2 [46] sowie die Histon-Deacetylasen [64]. In einigen Zelltypen interagiert die SK-2 im Zellkern direkt mit dem Histon-3 (H3) und es kommt zu einer vermehrten Acetylierung von H3 an Lysin⁹. In Zellen mit einer Überexpression der SK-2 kommt es zudem zu einer Acetylierung von H2B an Lysin¹² und von H4 an Lysin⁵. Das im Zellkern durch die SK-2 synthetisierte S1P bindet direkt und spezifisch an die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 und inhibiert diese. Die Hemmung von HDACs durch die SK-2 hat zur Folge, dass es zu einer vermehrten Expression von Genen wie p21 und c-fos kommt [64]. Die Erkenntnis, dass in vielen Geweben ein starker funktioneller Zusammenhang zwischen vermehrter HDAC-Aktivität und der Entstehung maligner Tumoren besteht, führte in den letzten Jahren zur Entwicklung einer Reihe von neuen therapeutischen Substanzen. Intrazelluläres S1P könnte daher das Gleichgewicht von Histonacetylierung und Histondeacetylierung beeinflussen und den Verlauf von Krebs durch die HDAC Inhibierung positiv regulieren. In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PPAR γ -Agonisten TRO und RSG in glomerulären Mesangiumzellen eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression der SK-1 bewirken. Ebenso konnte eine gesteigerte Aktivität der SK-1 gemessen werden. Die Autoren Pyne und Pyne konnten 2010 zeigen [172], dass mehrere Krebszelllinien eine erhöhte Expression der SK-1 aufweisen und für ihr Wachstum und Überleben diese benötigen. In einem Xenograft-Mausmodell wurde allerdings beschrieben, dass eine

Inhibierung der SK-1 eine Möglichkeit ist das Tumorwachstum zu hemmen [207-208]. Außerdem kann eS1P über die Aktivierung der fünf verschiedenen S1PRs zahlreiche zelluläre Prozesse wie Tumorwachstum, Überleben und Motilität regulieren [172]. Die Rolle von PPAR γ selber wird in diesem Zusammenhang jedoch kontrovers diskutiert. Einige Berichte deuten darauf hin, dass eine Aktivierung von PPAR γ zu einer verstärkten Tumorbildung führt, während laut anderen Berichten die Zellproliferation durch eine PPAR γ -Aktivierung nicht beeinflusst oder sogar gehemmt wird [209]. Es ist bekannt, dass PPAR γ in zahlreichen Krebszellen exprimiert wird, die aus dem Dickdarm, der Lunge, der Brust und der Prostata stammen. In den letzten Jahren hat sich zudem gezeigt, dass TZDs nicht nur antidiabetisch, sondern auch antiproliferativ und proapoptotisch wirken und PPAR γ auf diese Weise als Tumorsuppressor agiert [210]. Andere Studien zeigen aber auch, dass TZDs das Wachstum von Kolonkarzinomen in Mäusen begünstigen, die aufgrund einer Mutation im APC-Gen anfällig für Dickdarmpolypen sind [211-212]. Auch wenn diese Daten als Ausnahme gelten, zeigt es jedoch, dass PPAR γ unter besonderen Umständen auch als Tumorpromotor fungieren kann. Wie für PPAR γ wird auch die Assoziation von CTGF mit der Entstehung von Krebs und dessen Wachstum kontrovers diskutiert. In einigen Studien von Chien *et al.* [213] und Li *et al.* [66] konnte eine verminderte CTGF-Expression in Lungenkarzinomen und dem Nephroblastom gezeigt werden, die vermuten lässt, dass CTGF als ein Tumorsuppressor wirkt. Bei Bauchspeicheldrüsenkrebs konnte das Tumorwachstum und die Metastasenbildung durch den kürzlich entwickelten CTGF neutralisierenden Antikörper FG-3019 inhibiert werden [214]. Eine CTGF-Expression wurde aber auch von Yang *et al.* [131] bei der Tumorgenese von Prostatakrebszellen detektiert. Diese zum Teil gegensätzlichen Daten legen nahe, dass weitere Studien nötig sind um die durch PPAR γ -vermittelten S1P-Konzentrationen und die anschließend veränderten CTGF-Expressionen in zahlreichen Zellkompartimenten bei der Tumorbildung zu charakterisieren.

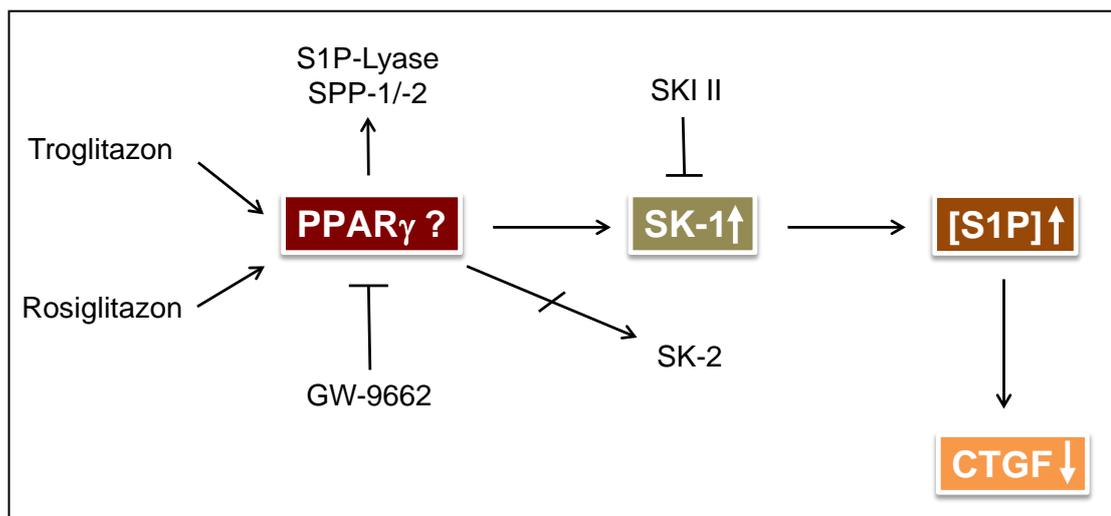


Abb. 43: Zusammenfassendes Schema der Wirkung von *peroxisome proliferator activated receptor* γ (PPAR γ)-Agonisten auf die Expression und Aktivität der Sphingosinkinase-1 (SK-1), intrazellulärer Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Synthese und *connective tissue growth factor* (CTGF)-Expression in Mesangiumzellen. Modifiziert nach Koch *et al.* [196].

Die PPAR γ -Agonisten Troglitazon (TRO) und Rosiglitazon (RSG) führen zu einem Anstieg der SK-1-Expression und Aktivität in Mesangiumzellen. Die SK-2 ist in ihrer Expression durch Thiazolidindione nicht beeinflusst. Diese Effekte resultieren wiederum in erhöhten intrazellulären S1P-Konzentrationen und einer verringerten CTGF-Expression. Die S1P abbauenden Enzyme S1P-Lyase und S1P-Phosphatasen (SPP1/2) sind in ihrer Expression nicht reguliert. Der PPAR γ -Antagonist GW-9662 und der SK-1 Inhibitor SKI II sind in der Lage die Effekte von TRO und RSG auf die SK-1 zu unterdrücken.

4.2 Wirkung von PPAR γ -Agonisten auf den S1P $_1$ -Rezeptor

Im Hinblick auf die Entstehung von Nierenerkrankungen wurde der Einfluss der PPAR γ -Agonisten TRO und RSG auf die S1PRs in Mesangiumzellen untersucht. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass TZDs eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression der SK-1 in renalen Mesangiumzellen der Ratte, der Maus und dem Menschen bewirken und die Aktivität der SK-1 gesteigert wurde. Funktionell resultierten die Effekte in erhöhten, iS1P-Konzentrationen und verringerten CTGF-Konzentrationen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den kürzlich publizierten Daten von Ren *et al.* (2009) die intrazellulärem aktivierten *caged* S1P einen anti-fibrotischen Effekt zuschreiben [67]. Weitere Funktionen von iS1P sind die Mobilisierung von Ca²⁺ aus Thapsigargin-sensitiven Speichern [63], die Hemmung von HDACs [64] und die Bindung als Kofaktor an die Ubiquitinligase TRAF2 [46], welche die NF- κ B-Aktivierung durch TNF- α vermittelt. Neben seiner Wirkung als intrazellulärer *second messenger* agiert S1P hauptsächlich extrazellulär als Rezeptoragonist für die fünf verschiedenen GPCRs (S1P $_{1-5}$) und reguliert zahlreiche Zellfunktionen wie Proliferation, Migration, Überleben und Zell-Zell-Kommunikation. Unter entzündlichen Bedingungen kommt es in

Nierenmesangiumzellen zu einer veränderten Migrationsrate, einer erhöhten Proliferationsrate sowie Sekretion von Entzündungsmediatoren und zu einer vermehrten Produktion von extrazellulären Matrixproteinen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass abhängig von der gewebespezifischen S1PR-Expression und der Kopplung von S1PRs an verschiedene G-Proteine, eS1P die Zellmigration entweder über den S1P₁-Rezeptor bzw. den S1P₃-Rezeptor stimulieren, oder aber auch über den S1P₂-Rezeptor inhibieren kann [70, 215]. Katsuma *et al.* (2002) postulierte, dass der S1P₂-Rezeptor und der S1P₃-Rezeptor in der mesangialen Proliferation beteiligt sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass der S1P₁-Rezeptor und der S1P₂-Rezeptor attraktive Zielstrukturen zur Behandlung von DN oder Lupus Nephritis darstellen [121-123, 216]. Deshalb sollte in diesem Zusammenhang die Wirkung von TRO und RSG auf die Expression der S1PRs analysiert werden. Durch die Verwendung der PPAR γ -Agonisten konnte unsere Arbeitsgruppe zum ersten Mal zeigen, dass die S1P₁-Rezeptor-mRNA-Expression in renalen Mesangiumzellen der Ratte und dem Menschen induziert wird. Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente wurden durch *in vivo* Experimente mit isolierten Glomeruli, aus mit TZDs behandelten Mäusen, bestätigt. Auch hier konnte eine erhöhte mRNA-Expression des S1P₁-Rezeptors gemessen werden. Im Einklang mit Daten von Gennero *et al.* [68] konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren S1P₁₋₃ und der S1P₅-Rezeptor in Rattenmesangiumzellen exprimiert werden. Darüber hinaus war die S1P₁-Rezeptor-mRNA- und Protein-Expression durch TRO und RSG in Rattenmesangiumzellen hoch reguliert. Auch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Regulation des S1P₁-Rezeptors durch TZDs über die Aktivierung funktioneller PPREs des S1P₁-Rezeptor-Promotors mit einer daraus resultierenden erhöhten Gentranskription und einer erhöhten Proteinneusynthese erfolgt. 1990 wurde von Hla und Maciag der S1P₁-Rezeptor als ein Genprodukt aus humanen, mit Phorbol ester stimulierten Endothelzellen isoliert [217]. Der murine Promotor für den S1P₁-Rezeptor wurde erstmals 1997 von Liu und Hla kloniert [218]. Er besitzt keine TATA-Sequenzen, dafür aber zahlreiche GC-Elemente. Die Initiation der Transkription geschieht von einem singulären Startpunkt aus. Für die Promotorstudien des S1P₁-Rezeptors wurde aus genomischer Ratten-DNA ein 886 bp-langes Fragment kloniert und nach Inkubation mit TRO und RSG untersucht. Nach der Behandlung mit TZDs zeigte der Promotor eine gesteigerte Aktivität. Um den Promotor bezüglich der dafür verantwortlichen Transkriptionsfaktoren genauer zu analysieren, konnte durch detaillierte Sequenzanalysen ein putatives PPRE innerhalb des S1P₁-

Rezeptor-Promotors ermittelt werden. Nach einer Punktmutation des PPRE konnte der Promotor nicht mehr durch die PPAR γ -Agonisten TRO und RSG aktiviert werden. Diese Daten bestätigen, dass das PPRE funktionell aktiv ist. Mit Hilfe eines EMSA konnte die Funktionalität und Spezifität des PPRE im Promotor des S1P₁-Rezeptors durch TZDs wie zuvor in dieser Arbeit beschrieben, bestätigt werden. Um sicher zu stellen, dass PPAR γ an das PPRE bindet, sind auch in diesem Fall in weiteren Experimenten *Supershift*-Analysen mit einem spezifischen Antikörper gegen PPAR γ nötig.

Funktionelle Daten aus unserer Arbeitsgruppe deuten drauf hin, dass die S1PRs S1P₂ und S1P₃ für eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern in Mesangiumzellen der Ratte verantwortlich sind. Die durch PPAR γ -vermittelte Regulation des S1P₁-Rezeptors unterdrückt vielmehr die S1P-induzierte Ca²⁺-Mobilisierung aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern. Darüber hinaus konnte für den S1P₁-Rezeptor auch eine wichtige Rolle bei der Migration und der Proliferation von Krebszellen nachgewiesen werden und es stellte sich heraus, dass eine von SK-1 abhängige S1P-Synthese für den weiteren Verlauf von Tumorwachstum entscheidend ist [219]. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich der Wachstumsfaktor VEGF beschrieben, der die Expression des S1P₁-Rezeptors induziert [220-221]. Ferner spielt der S1P₁-Rezeptor auch eine Rolle bei der Neovaskularisierung von Tumoren, da der S1P₁-Rezeptor entweder Komplexe mit dem VEGF-Rezeptor 2 oder mit dem PDGF-Rezeptor- β bilden kann [219]. Die in dieser Arbeit beschriebene PPAR γ -abhängige Aktivierung der SK-1 und die erhöhte Expression des S1P₁-Rezeptors könnte in diesem Zusammenhang für die Tumorprogression bedeutsam sein. Wie auch schon in Kapitel 4.1 beschrieben, wird die Rolle von PPAR γ kontrovers diskutiert, da PPAR γ zum einen als Tumorsuppressor, zum anderen aber auch als Tumorpromotor agieren kann [209]. PPAR γ -Agonisten können aber auch anti-inflammatorisch und protektiv bei Nierenerkrankungen wie der DN und der Ischämie Reperfusion Schädigung wirken [222]. 2011 konnte Park *et al.* [223] zeigen, dass eine chronische Aktivierung des S1P₁-Rezeptors mit SEW 2871 eine DN bei Mäusen im Anfangsstadium lindern kann. Außerdem konnten sie in einem Mausmodell zeigen, dass eine Aktivierung der SK-1 und anschließender S1P₁-Rezeptorexpression vor renaler ischämischer Reperfusion schützt [223]. Die Beeinflussung des Sphingolipidmetabolismus durch TZDs könnte ein weiterer interessanter Ansatzpunkt zur Therapie von renalen Erkrankungen sein. Dennoch muss in weiteren Studien die Rolle der durch PPAR γ -induzierten SK-1-Aktivität, die S1P-Bildung und die S1P₁-Rezeptorexpression in unterschiedlichen Zellen und Zellkompartimenten untersucht

werden. Außerdem bleibt in weiteren Analysen zu klären, ob die in diesem Teil der Arbeit gezeigte TZD-abhängige Regulation des S1P₁-Rezeptors mit einer veränderten Expression von CTGF einhergeht.

4.3 Wirkung von extrazellulärem S1P auf die Expression der COX-2 und Biosynthese von PGE₂ in Mesangiumzellen

Neben ihrer Funktion als Regulator der GFR, spielen Mesangiumzellen bei der Entstehung von Nierenerkrankungen wie der GN oder der DN eine wichtige Rolle [224-225]. Abgesehen von einer erhöhten Proliferationsrate und einer gesteigerten Produktion extrazellulärer Matrixproteine, ist die Sekretion von entzündlichen Zytokinen durch Mesangiumzellen ein Kennzeichen einer GN oder DN. In diesem Zusammenhang konnte Hirose *et al.* zeigen, dass die beiden Isoformen der COX, COX-1 und COX-2, in glomerulären Mesangiumzellen der Ratte einer Anti-Thy1.1-induzierten mesangioproliferativen GN hoch reguliert sind [226]. Tomasoni *et al.* [227] konnten vergleichbare Befunde in Nieren von Patienten mit einer aktiven Lupus-Nephritis beschreiben. Es ist bekannt, dass die COX-1 in den meisten Organen konstitutiv exprimiert wird und als sogenanntes *house-keeping* Enzym Prostaglandine produziert, die weitreichende physiologische Funktionen wie den Schutz der Magenmukosa, der Homöostase der Blutgerinnung oder des renalen Wasser- und Elektrolythaushaltes haben [139]. Die COX-2 hingegen ist ein induzierbares Protein, welches durch eine Vielzahl unterschiedlicher Reize, wie Wachstumsfaktoren, Zellstress, Zytokine und Entzündungsmediatoren neu synthetisiert wird und durch die Bildung von Prostaglandinen an vielfältigen Prozessen des Organismus, wie z.B. Schmerz, Fieber, Angiogenese und vor allem bei der Regulation der Immunantwort eine Rolle spielt [145]. Wie zuvor erwähnt, ermöglicht die COX-2 die Bildung entzündlicher Prostaglandine, wie beispielsweise PGE₂, das in dieser Arbeit näher betrachtet wurde. Das Substrat der Prostaglandin-Synthese ist die AA, welche durch die PLA₂ aus Phospholipiden der Plasmamembran freigesetzt wird. Die Initialreaktion, die Umwandlung von AA zu PGG₂ und nachfolgend zu PGH₂ wird durch die COX katalysiert. In einer zweistufigen Reaktion kommt es zunächst durch die COX-Aktivität von COX-2 zur Bildung des Zwischenproduktes PGG₂, das durch die Peroxidase-Aktivität des Enzyms sofort zu PGH₂ umgewandelt wird. PGH₂ ist die gemeinsame Vorstufe der Prostaglandine, die zell- bzw. gewebespezifisch mit Hilfe

spezieller Synthesen gebildet werden. Zu den wichtigsten Prostaglandinen zählen PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 und TXA_2 . In zahlreichen aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass S1P in der Lage ist die COX-2 zu induzieren und die Induktion gewebeabhängig über verschiedene Signalwege durch unterschiedlich aktivierte S1PRs erfolgen kann. In Folge dessen wird die Synthese von pro-inflammatorischem PGE_2 aktiviert [70, 84, 223]. Nodai *et al.* (2007) veröffentlichte, dass in glatten Gefäßmuskelzellen, welche fast ausschließlich den S1P₂-Rezeptor und den S1P₃-Rezeptor exprimieren, die Induktion der COX-2-Expression über den S1P₃-Rezeptor vermittelt wird [143]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigte die Arbeitsgruppe von Ferrer jedoch, dass die S1P-induzierte COX-2-Expression in der Wilms Tumorzelllinie WiT49 über den S1P₂-Rezeptor verläuft [141]. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Daten von Skoura *et al.*, der eine verringerte COX-2-Expression in der Retina von S1P₂-Rezeptor^{-/-}-Mäusen beschrieben hat [156]. Im Gegensatz dazu zeigten Kim *et al.* [228], dass eine Transfektion mit S1P₁-oder S1P₃-, aber nicht S1P₂-Rezeptor-*antisense*-Oligonukleotiden die S1P-induzierte COX-2-Expression und PGE_2 Synthese in humanen WISH-Zellen aus dem Amnion inhibiert. In glomerulären Mesangiumzellen konnten die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Signaltransduktion von S1P auf die COX-2-Expression und die aus diesen Beobachtungen resultierende pathophysiologische Relevanz noch nicht abschließend geklärt werden. Aus diesem Grund sollte in diesem zweiten Teil der Arbeit die funktionelle Rolle von S1P auf die Expression und Aktivität der COX-2 in renalen Mesangiumzellen analysiert werden. In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass die mRNA- und Proteinexpression der COX-2 durch eS1P in Rattenmesangiumzellen dosisabhängig induziert wurde. Die mRNA-Expression der COX-1 zeigte dabei keine Effekte. Mit Hilfe von pharmakologischen und genetischen Inhibitionsstrategien konnte der S1P₂-Rezeptor als der verantwortliche Rezeptorsubtyp für die S1P-induzierte COX-2-Expression charakterisiert werden. Die nachfolgende Signalweiterleitung erfolgte in Rattenmesangiumzellen G_i-gekoppelt über die Aktivierung der p42/p44 MAPK. Auch waren die basalen PGE_2 -Konzentrationen nach einer Stimulation von Rattenmesangiumzellen mit S1P erhöht, die durch die zusätzliche Verwendung von COX-2-induzierendem Ang II weiter gesteigert werden konnte. Außerdem wurden in Rattenmesangiumzellen die S1P-induzierten Effekte auf die COX-2-Expression auch in Gegenwart des pro-entzündlichen Zytokins IL-1 β gemessen, die bereits Ohama *et al.* in Darmfibroblasten der Maus messen konnte und nach S1P ebenfalls als amplifiziert gefunden wurden [184].

Extrazelluläres S1P aktiviert spezifische GPCRs an der Zelloberfläche, die zum Teil gegensätzliche zelluläre Effekte vermitteln. So führt die Bindung von S1P an den S1P₂-Rezeptor zu einer Hemmung der Tumorangio-genese und des Tumorstwachstums [229]. Über den S1P₁-Rezeptor werden tumorigene Effekte durch die Förderung der Angio-genese vermittelt. Abhängig von der Zelltypspezifität sind zu diesem Zeitpunkt mindestens drei Isoformen der S1PRs, S1P₁₋₃ in der S1P-vermittelten COX-2-Expression und PGE₂-Bildung beteiligt [143, 66, 228]. Um heraus zu finden welcher der drei genannten S1PRs Isoformen in glomerulären Mesangiumzellen der Ratte für die S1P-induzierte COX-2-Expression und PGE₂-Synthese verantwortlich ist, wurden in dieser Arbeit die pharmakologischen Antagonisten JTE-013 (S1P₂-Rezeptorantagonist), W146 (S1P₁-Rezeptorantagonist) und VPC 23019 (S1P₁- und S1P₃-Rezeptorantagonist) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der COX-2 durch den S1P₂-Rezeptorantagonisten JTE-013 aufgehoben wurde. Dagegen war die COX-2-Expression durch die pharmakologischen Inhibitoren des S1P₁-Rezeptors bzw. des S1P₁- und S1P₃-Rezeptors nicht reduziert. Allerdings wird die Spezifität dieser S1PR-Antagonisten kontrovers diskutiert [230]. In diesem Zusammenhang konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass JTE-013 die Ang II-induzierte PGE₂-Synthese in Rattenmesangiumzellen inhibierte und JTE-013 auf diese Weise auch als ein direkter Antagonist für Ang II Rezeptoren oder Signaltransduktor wirken könnte. Um die gewonnenen Ergebnisse mit den verwendeten S1PR-Antagonisten zu konsolidieren, wurden darauf aufbauend Versuche mit der phosphorylierten Form von Fingolimod, pFTY720, durchgeführt. Es ist bekannt, dass pFTY720 in der Lage ist bis auf den S1P₂-Rezeptor alle anderen Rezeptorsubtypen zu aktivieren [70]. Bemerkenswerter Weise war der Immunmodulator nicht in Lage die Expression der COX-2 zu induzieren. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis auf eine S1P₂-Rezeptor-vermittelte COX-2-Induktion. Auch war die mRNA- und Proteinexpression der COX-2 nach der Verwendung von siRNA gegen den S1P₂-Rezeptor um ca. 75 % verringert. In diesem Zusammenhang zeigen die Ergebnisse zeigen, dass in glomerulären Mesangiumzellen der Ratte die Vermittlung der S1P-induzierten COX-2-Expression durch den S1P₂-Rezeptorsubtyp stattfindet. Wie bereits erwähnt, konnten auch Skoura *et al.* zeigen, dass der S1P₂-Rezeptor in Zellen der Mausretina eine wichtige Rolle bei der S1P-vermittelten COX-2-Expression spielt [156]. S1PRs entfalten ihre unterschiedlichen Wirkungen durch verschiedene Signalkaskaden, die über die Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen wie G_{i/o}-, G_q- und G_{12/13}-gekoppelt sind [70]. Es ist bekannt,

dass der S1P₁-Rezeptor ausschließlich an G_{i/0}-, der S1P₂- und der S1P₃-Rezeptor an G_{i/0}-, G_q- und G_{12/13}-, der S1P₄- und der S1P₅-Rezeptor an G_{i/0}- und G_{12/13}-Signalwege koppeln [69-70]. Um die Signalweiterleitung des S1P₂-Rezeptors näher zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der G_{i/0} Inhibitor PTX eingesetzt. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten bestätigen, dass der S1P₂-Rezeptor laut vielen Studien eine wichtige Rolle in der S1P-vermittelten COX-2-Expression einnimmt [143, 184, 231]. Eine Vorstimulation mit 100 ng/ml von PTX führte zu einer signifikanten Inhibierung der COX-2-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutet auf eine G_{i/0}-gekoppelte Interaktion mit dem Rezeptor hin. Desweiteren zeigte der G_{12/13} Rho-abhängige Kinase (ROCK) Inhibitor Y 27632 keine deutliche Verringerung der COX-2-Expression. Diese Daten untermauern die durch G_{i/0}-vermittelte Signalweiterleitung der S1P-induzierten COX-2-Expression in Mesangiumzellen der Ratte. Eine G_{i/0}-gebundene Signalweiterleitung ist im Allgemeinen mit einer Aktivierung der p42/p44 MAPK verbunden [70]. Unsere Arbeitsgruppe konnte 2004 zeigen, dass S1P über die S1PRs in der Lage ist, alle drei verschiedenen MAPKs zu aktivieren [204]. Zu den drei wichtigsten MAPK-Subfamilien zählen die p42/p44 MAPK (ERK1/2), die p38 MAPK und die JNK/SAPKs. Im Einklang damit konnte in dieser Arbeit eine Phosphorylierung der p42/p44 MAPK mit 1 µM S1P bereits nach 5 Minuten detektiert werden. Allerdings kam es durch die Stimulation mit 1 µM S1P zusätzlich zu einer weiteren Phosphorylierung nach 60 Minuten. Durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren gegen ERK1/2 und p38 MAPK wurde in dieser Dissertation festgestellt, dass die Weiterleitung der übertragbaren Signale in Rattenmesangiumzellen über ERK1/2-vermittelte Wege erfolgt. Die spezifischen MEK1/2-Inhibitoren PD 98059 und U0126 führten durch Koinkubation mit S1P zu einer signifikanten Reduktion der COX-2-Expression. Untersuchungen mit dem spezifischen p38 MAPK-Inhibitor SB 203580 ergaben keine signifikante Expressionshemmung der COX-2 in unserem Zellmodell. Da dieser Inhibitor keine Wirkung auf die COX-2-Expression ausgeübt hat, deutet die Aktivierung der *downstream* von S1P₂-Rezeptor und G_{i/0}-lokalisierten p42/p44 MAPK-Kaskade darauf hin in Rattenmesangiumzellen in der S1P-vermittelten COX-2-Expression beteiligt zu sein. Unsere Ergebnisse ergänzen eine Vielzahl der Zelltypen, in denen die Aktivierung von ERK1/2 durch S1P bereits beschrieben wurde. Die Aktivierung der p42/p44 MAPK-Kaskade durch S1P wurde u.a. in HUVEC, COS-1-Zellen und Rat-2-Zellen nachgewiesen [232-234]. Ebenso wurde von Hsieh und Kim in HeLa und WISH Zellen nachgewiesen, dass die S1P-induzierte COX-2-

Expression über den ERK1/2-Signalweg verläuft [177, 228]. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit. Über die Rolle von ERK1/2 bei der COX-2-Expression gibt es aber auch widersprüchliche Ergebnisse. Dragusin *et al.* zeigte, dass in Endothelzellen der Ratte beide Kinasen, die p42/p44 MAPK und die p38 MAPK an der S1P-induzierten COX-2-Expression beteiligt sind [231]. In einer Studie von Nodai *et al.* [143] an glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte hat ERK1/2 keinen Einfluss auf die COX-2-Expression nach Induktion mit S1P. Vielmehr postuliert diese Arbeitsgruppe, dass die Signalweiterleitung über eine Ca^{2+} -abhängige PKC und durch die Tyrosinkinase Src vermittelt wird [143]. Bei Untersuchungen an Herzmuskelzellen konnte LaPointe *et al.* zeigen [235], dass die beiden MAPK-Signalwege p38 und p42/p44 eine Rolle bei der Regulation der COX-2 spielen. Eine Untersuchung von Liu *et al.* konnte zeigen, dass durch die Behandlung mit IL-1 β die COX-2-Expression in HAT-29 Magenkrebszellen über den JNK-, ERK1/2- sowie den PI3-Kinase-Signalweg induziert werden kann [236]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle der p42/p44 MAPK in der S1P-vermittelten Signalweiterleitung offenbar stark abhängig vom Zelltyp ist. Außerdem konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass die S1P-abhängige COX-2-Induktion transkriptionell durch die Aktivierung des S1P₂-Rezeptors reguliert wird, da in Versuchen mit dem Transkriptionshemmer Act D, eine Induktion der COX-2 mit S1P keine Stabilisierung der COX-2-mRNA in Rattenmesangiumzellen hervorrief.

Funktionell ist die COX-2 für eine erhöhte Prostaglandinsynthese in entzündlichem Gewebe verantwortlich [144]. In der Niere spielen Prostaglandine sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch eine wichtige Rolle. So sind sie für die Aufrechterhaltung der Homöostase und der Regulation von verschiedenen Nierenfunktionen wie der Renin-Sekretion, tubulärer Transportprozesse, der Hämodynamik sowie der Proliferation und Apoptose wichtig [99]. Auf der anderen Seite spielen sie aber auch bei pathophysiologischen Prozessen von Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle [237]. So wurde im Modell der anti-Thy1.1-induzierten mesangioproliferativen GN und in Nieren von Mäusen mit Lupus-Nephritis eine erhöhte renale TxA₂-Konzentration gefunden. Im Fall einer durch STZ-induzierten DN kam es zu einer gesteigerten PGE₂-, PGI₂- und TxA₂-Synthese. Die Inhibierung der TxA₂-Synthese Aktivität wiederum führte zu einer Verbesserung der Nierenfunktion, indem die GFR erhöht und die gesteigerte Ausscheidung von Proteinen mit dem Urin verringert wurde [227]. In dieser Arbeit wurde das

Prostaglandin PGE₂ näher untersucht. Zusätzlich zu der S1P-induzierten COX-2-Expression wurden in Rattenmesangiumzellen erhöhte PGE₂-Konzentrationen gemessen. Wie im Ergebnisteil gezeigt, kam es durch S1P basal nur zu einer geringen Steigerung der PGE₂-Konzentrationen um circa 30 % im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt könnte auf eine unzureichende Aktivierung der PLA₂ zurück zu führen sein [238]. Stimuli, wie beispielsweise Interleukine (IL-1, IL-6), TNF- α , Ang II und Thrombin führen zu einer verstärkten Expression bzw. Aktivierung der normalerweise in inaktiver Form vorliegenden PLA₂. In Rattenmesangiumzellen führt die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen zu einer Induktion des sPLA₂-IIa-Gens und zu einer gesteigerten Produktion von PGE₂ [239-240]. Durch die Aktivierung der PLA₂ kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von AA, die anschließend durch die COX-2 in PGE₂ umgewandelt werden kann. In diesem Zusammenhang konnten Johann *et al.* zeigen, dass S1P in RAW264.7-Makrophagen die COX-2-Expression zwar induziert, aber nicht die PLA₂ aktiviert und es in Folge dessen zu keiner PGE₂-Freisetzung kommt [240]. Auch Payne *et al.* beobachteten, dass S1P die enzymatische Aktivität der cPLA₂ nicht beeinflusst [241]. Jedoch zeigte die Arbeitsgruppe von Chen *et al.*, dass S1P die cPLA₂ α in Lungenepithelzellen über eine S1P₃-Rezeptor-abhängige Ca²⁺-Freisetzung aktiviert [242]. Da in dieser Arbeit die Wirkung von S1P auf die Expression und Aktivität der PLA₂ in Rattenmesangiumzellen nicht näher untersucht wurde, kann trotz der deutlich gezeigten Effekte von S1P auf die COX-2-Expression über die geringe basale PGE₂-Synthese nur spekuliert werden. Zum einen könnte die fehlende Aktivierung der PLA₂ durch S1P ein Grund sein, zum anderen könnten aber auch technische Schwierigkeiten eine Rolle spielen. Wie schon im Ergebnisteil erwähnt, waren die absoluten PGE₂-Konzentrationen in den Überständen von Rattenmesangiumzellen nahe der Detektionsgrenze des verwendeten PGE₂-ELISA-Kits. Um die basale PGE₂-Konzentration zu erhöhen, wurden deshalb die Zellen nach der erfolgten S1P-Stimulation mit 100 nM Ang II für weitere 10 Minuten behandelt. Dadurch kam es in Mesangiumzellen zu einer Steigerung der PGE₂-Konzentrationen um weitere 42 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach der kurzen Ang II Stimulation führte 1 μ M S1P zu einer 3,5-fachen Induktion der Prostaglandinsynthese verglichen mit den basalen Konditionen. Diese Resultate sprechen für die bereits erläuterte Ang II-abhängige, verstärkte Arachidonsäurefreisetzung in Mesangiumzellen [243]. Trotz der durch S1P massiv verstärkten COX-2-Expression könnte die geringe Arachidonsäurefreisetzung durch die fehlende PLA₂-Aktivierung der Grund für die

schwache PGE₂-Synthese unter basalen Bedingungen sein. Es wurde bereits gezeigt, dass für die Übertragung von Signalen durch eS1P über den S1P₂-Rezeptor der p42/p44 MAPK-Signalweg von Bedeutung ist. Um heraus zu finden ob die Aktivierung dieser Kinase-Kaskade *downstream* des S1P₂-Rezeptors für die verstärkte Bildung von PGE₂ eine Rolle spielt, wurden Rattenmesangiumzellen mit dem spezifischen MEK1/2-Inhibitor PD 98059 vorinkubiert. Im Ergebnisteil ist klar gezeigt, dass dieser Weg der Signalweiterleitung von Bedeutung ist, da die S1P-vermittelten PGE₂-Anstiege durch PD 98059 signifikant unterdrückt wurden. Die Rolle des ERK1/2-Signalweges bei der COX-2- und PGE₂-Expression wird auch durch die Arbeit von LaPointe *et al.* unterstrichen [233]. Im Gegensatz zu den unspezifischen Effekten von JTE-013, beeinflusst PD 98059 nicht die Ang II-abhängige PGE₂-Synthese in Mesangiumzellen. In diesem Zusammenhang konnten Studien bereits zeigen, dass die Aktivierung der p42/p44 MAPK für die Ang II-abhängige Induktion der COX-2-Expression nicht relevant zu sein scheint [244-245].

4.4 Wirkung von extrazellulärem S1P und IL-1 β auf die COX-2-Expression und Biosynthese von PGE₂ in Mesangiumzellen

Neben S1P können auch verschiedene Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren wie IL-1 β , TNF- α oder LPS die COX-2-Expression und Prostaglandinbiosynthese induzieren, was in Rattenmesangiumzellen mit IL-1 β gezeigt wurde [246-247]. Zusätzlich induziert IL-1 β in diesem Zelltyp auch die cPLA₂- und PGE₂-Synthese [239-240, 248]. Wie in anderen Publikationen beschrieben, kann die durch IL-1 β oder TNF- α induzierte COX-2-Expression in zahlreichen Zelltypen wie Lungenkrebszellen, Magenkrebszellen oder Fibrosarkomzellen durch S1P weiter potenziert werden [249-251]. In einer jüngst veröffentlichten Studie von Ohama *et al.* konnte gezeigt werden, dass S1P die Effekte von IL-1 β auf die COX-2-Expression in Myofibroblasten der Maus verstärkt [184]. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Daten aus meiner Arbeit, in der eine dosisabhängig gesteigerte Expression der COX-2 und PGE₂-Synthese nach Stimulation mit IL-1 β und S1P in Rattenmesangiumzellen detektiert werden konnte. Diese Effekte konnten unter Verwendung des spezifischen MEK1/2-Inhibitors PD 98059 aufgehoben werden. Der p42/p44 MAPK-Signalweg spielt auch unter pro-inflammatorischen Bedingungen in Rattenmesangiumzellen bei der Signalweiterleitung eine Rolle. Allerdings postulierten

Moon *et al.*, dass S1P die IL-1 β induzierte COX-2-Expression und PGE₂-Bildung über den S1P₁-Rezeptor in humanen Chondrozyten inhibiert und auf diese Weise anti-inflammatorisch und nicht wie in dieser Arbeit beobachtet pro-inflammatorisch wirkt [252]. Auch konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen, dass S1P in Gegenwart von IL-1 β anti-inflammatorisch wirkt, indem die durch IL-1 β -induzierte Expression und Aktivität der sPLA₂ in Rattenmesangiumzellen durch S1P signifikant herunter reguliert wurde. Dadurch kam es zu einer geringeren Arachidonsäurefreisetzung und PGE₂-Bildung [204]. Aufgrund der Tatsache, dass während dieser Arbeit in Rattenmesangiumzellen nach S1P- und IL-1 β -Stimulation weder die Aktivität der cPLA₂ oder iPLA₂ noch die Konzentrationen freier AA gemessen wurden, sind weitere Versuche notwendig um diese Unterschiede zu klären. Auch ist es wichtig den durch S1P vermittelten Mechanismus der Prostaglandinbiosynthese in Rattenmesangiumzellen näher zu charakterisieren, da eine Beeinflussung des S1P/S1P₂-Rezeptorsignalwegs eine Zielstruktur für die zukünftige Behandlung von Nierenerkrankungen wie der GN, DN oder Lupus-Nephritis sein könnte.

4.5 Wirkung von intrazellulärem S1P auf die Expression der COX-2 in Mesangiumzellen

Intrazellulär wird S1P in erster Linie mit Hilfe der SKs durch Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P gebildet [62] und wirkt dort als klassischer *second messenger*. Bekannte Funktionen von iS1P sind die Mobilisierung von Ca²⁺ aus Thapsigargin-sensitiven Speichern [63], die Hemmung von HDACs [64] und die Bindung als Kofaktor an die Ubiquitinligase TRAF2 [46], welche die NF- κ B-Aktivierung durch TNF- α vermittelt. In Kapitel 4.3 konnten wir zeigen, dass eS1P über den S1P₂-Rezeptor eine Induktion auf die COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen bewirkt und dass die Signalweiterleitung G_{i/o}-gekoppelt über den p42/p44 MAPK-Signalweg verläuft. Daher sollte anschließend die Wirkung von iS1P auf die COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen näher untersucht werden. Es ist bekannt, dass zahlreiche exogene Stimuli wie TNF- α , TGF- β , IL-1 β , VEGF oder PDGF die SK-1 aktivieren und so zu einer vermehrten intrazellulären Bildung von S1P führen, welches für die Regulation zahlreicher inflammatorischer Prozesse von Bedeutung ist [2, 192, 253-254]. Pettus *et al.* [250] konnten zeigen, dass die in Gegenwart von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α hervorgerufene Expression der COX-2 mit einer gesteigerten PGE₂-Biosynthese einhergeht und von der Aktivierung der SK-1 und der Bildung von S1P abhängig ist. Somit nimmt die SK-1 eine wichtige Rolle in der

Regulation des Eicosanoidmetabolismus ein. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Wirkung der pharmakologischen SK-1-Inhibitoren SKI II und DMS auf die basale COX-2-Expression in Rattenmesangiumzellen analysiert, die dosisabhängig durch die genannten Inhibitoren induziert wurde. Auch in Mausmesangiumzellen, isoliert aus SK-1 defizienten Mäusen war die Expression der COX-2 signifikant erhöht was in Einklang mit einer ebenfalls signifikant erhöhten PGE₂-Biosynthese steht.

Die gewonnenen Daten deuten auf einen anti-inflammatorischen Wirkmechanismus der SK-1 hin. Die Wirkungsweise der SK-1 wird jedoch kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die SK-1 eine Rolle bei der Bildung und dem Wachstum von Tumoren sowie während der Angiogenese spielt und somit wachstumsfördernd wirkt [255-257]. Es wird vermutet, dass durch die erhöhte Expression der SK-1 und einer daraus resultierenden hohen S1P-Konzentration eine Verschiebung des Sphingolipidgleichgewichtes in Richtung Proliferation und Zellwachstum bewirkt wird. Van Brocklyn *et al.* [258] und Li *et al.* [259] beschrieben, dass eine gesteigerte SK-1-Expression mit einer geringeren Überlebensrate der Patienten korrelierte, wodurch diesem Enzym eine eindeutige Rolle im Tumorwachstum zugesprochen werden konnte. In diesem Zusammenhang konnten French *et al.* 2006 [208] durch die Verwendung von SK-1 Inhibitoren das Wachstum von Tumoren *in vitro* und *in vivo* in Mäusen inhibieren. Auf der anderen Seite wird der SK-1 eine protektive, anti-inflammatorisch wirkende Rolle zugesprochen. So konnte vor kurzem unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass im Krankheitsmodell der durch STZ induzierten DN die SK-1 protektiv wirkt, da in Mäusen mit genetischer Defizienz der SK-1 die DN stärker ausgeprägt war als in WT-Tieren. Ren *et al.* postulierten, dass der unterdrückende Effekt der SK-1 ausschließlich durch intrazelluläres vermittelt wird und iS1P auf diese Weise anti-fibrotisch wirkt. [192]. Im Gegensatz dazu wurde durch den Einsatz von eS1P die Expression von CTGF erhöht, wodurch es zu einer verstärkten Fibrose kam, was zeigt, dass eS1P pro-fibrotisch agiert. Jedoch ist der intrazelluläre Wirkmechanismus von S1P in Bezug auf die CTGF-Expression noch nicht geklärt. Außerdem konnte Hofmann *et al.* (2008) zeigen, dass die SK-1 vor Apoptose schützt. Die Behandlung von WT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen mit Staurosporin führte zu einer erhöhten Apoptoserate, die in SK-1 defizienten Zellen verstärkt war [260]. Die anti-apoptotische Rolle der SK-1 in dieser Arbeit könnte demnach auf die intrazelluläre Weiterleitung von Signalen zurückzuführen sein. In Zukunft bleibt zu

klären, welche Aufgaben S1P intra- und extrazellulär wahrnimmt und ob in einem *in vivo* Kontext der SK-1 ein positiver oder negativer Effekt zugesprochen werden kann.

4.6 Therapeutische Relevanz

Neben ihrer Funktion als strukturelle Membranbestandteile spielen Sphingolipide auch eine wichtige Rolle als Signalmoleküle, die bei der Regulation elementarer Zellprozesse wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose mitwirken und somit für die Zellentwicklung und Homöostase unerlässlich sind. Eine Störung des Lipidstoffwechsels geht mit der Entstehung und Progression zahlreicher Erkrankungen wie der Arteriosklerose, Asthma, Diabetes, entzündlichen Nierenerkrankungen und Krebs einher. Darüber hinaus ist der Sphingolipidmetabolismus auch bei der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen beteiligt. Diese Erkenntnisse fördern die Suche nach geeigneten Arzneimitteln, die in das gestörte Gleichgewicht des Sphingolipidsignaling, insbesondere an SK-1 und dem gebildeten S1P eingreifen können. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die SK-1 durch tumorrelevante Wachstumsfaktoren wie EGF, Prolaktin und Östrogen in Brustkrebszellen induziert und chronisch aktiviert wird [261-262]. Eine erhöhte Expression der SK-1 wurde auch in vielen anderen Tumorarten nachgewiesen, was mit einer schlechteren Überlebensrate einherging [47, 263]. Es wird vermutet, dass durch die erhöhte Expression der SK-1 die S1P-Spiegel erhöht werden und es dadurch zu einer Verschiebung des Sphingolipid-Rheostats in Richtung Zellwachstum und Proliferation kommt. S1P wird in diesem Fall durch die SK-1 zu Lasten der pro-apoptotischen Vorläufer Sphingosin und Ceramid synthetisiert. Um die Wirkung von S1P gezielt zu hemmen wurde ein neutralisierender monoklonaler Antikörper entwickelt, der vorrangig freies S1P im Blut binden und inaktivieren soll. In einem Maus-Tumormodell konnte dieser das Tumorwachstum von Mamma- und Ovarial-Karzinomen stark verzögern [264]. Eine humanisierte Form dieses Antikörpers wurde 2009 von O'Brien *et al.* entwickelt, der sich heute unter dem Namen *Sonecizumab* als Therapeutikum gegen verschiedene Tumorarten sowie die altersbedingte Makuladegeneration in der klinischen Phase I befindet [265-266]. Auch S1PR-Agonisten bzw. -Antagonisten könnten potenzielle Therapieansätze für die Behandlung zahlreicher Erkrankungen sein. In diesem Zusammenhang konnten Paugh *et al.* (2003) zeigen, dass das Sphingosin-Analogon FTY720 als Agonist für 4 der 5 bekannten S1PRs wirken kann und in der Lage ist experimentelle Autoimmunerkrankungen zu inhibieren [267]. Im September 2010 wurde dieser Wirkstoff

unter dem Namen *Fingolimod* als erstes oral wirksames Therapeutikum gegen Multiple Sklerose zugelassen. Desweiteren stellt die SK-1 in Mesangiumzellen ein Angriffspunkt für entzündliche Nierenerkrankungen wie einer GN oder einer Fibrose dar, da durch eine gezielte Hemmung dieses Enzyms einerseits die häufig beobachtete Hyperproliferation reduziert und auf der anderen Seite die Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Matrixenzymen beeinflusst werden können. Die Inaktivierung von S1P, die Entwicklung von SK-1 Inhibitoren sowie die Synthese spezifischer S1P-Agonisten sind potenzielle, neue Therapieansätze für die Behandlung von entzündlichen Krankheiten.

Neben den Sphingolipiden besitzen auch PPARs essentielle Funktionen im Lipidstoffwechsel und sind seit ihrer Entdeckung zu einer wichtigen Zielstruktur in der Arzneimittelforschung geworden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von PPAR γ zu einer Inhibierung der Zellproliferation und der Induktion von Apoptose führt [267-270]. Die Aktivierung von PPAR γ durch TZDs könnte eine wirksame Therapieoption für die Behandlung von Tumorerkrankungen sein. Zudem weisen PPAR γ -Agonisten neben ihrer Funktion als Insulin-Sensitizer auch anti-fibrotische Effekte auf. Die Daten meiner Doktorarbeit zeigen, dass PPAR γ -Agonisten auch in der Therapie von entzündlichen Nierenerkrankungen wie der Fibrose eingesetzt werden könnten. Durch den Einsatz der TZDs TRO und RSG wurde der intrazelluläre Sphingolipidmetabolismus in glomerulären Mesangiumzellen beeinflusst. Die Behandlung der Zellen mit TZDs führte zu einem Anstieg der mRNA- und Proteinexpression der SK-1 sowie zu einer gesteigerten Aktivität der SK-1. Diese Effekte wiederum resultierten in erhöhten iS1P-Konzentrationen und verringerten Konzentrationen des pro-fibrotischen Bindegewebswachstumsfaktors CTGF. Trotz der bekannten Nebenwirkungen von TZDs könnten strukturelle Veränderung [105] ein erneut auflebendes Interesse an diesen Substanzen bewirken und zu einem Einsatz in der Therapie von Diabetes sowie entzündlichen Krankheiten führen.

Auch die COX-2 sowie der S1P/S1P₂-Rezeptorsignalweg stellen bei der Entwicklung neuer Therapieansätze zur Bekämpfung von zahlreichen Erkrankungen wie z.B. Krebs oder inflammatorischen Nierenerkrankungen ein interessantes Ziel dar. COX-2 wird in einer Vielzahl von Tumorstufen und Tumoren verstärkt synthetisiert und spielt bei der Kanzerogenese eine entscheidende Rolle. Eine Überexpression der COX-2 kann sogar die Entstehung von Tumoren auslösen [271]. Auch pharmakologische Daten sprechen für eine Beteiligung der COX-2 an der Tumorgenese. Daraufhin wurden verschiedene selektive

COX-2-Hemmer wie Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib oder Etoricoxib entwickelt. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die selektiv entwickelten COX-2-Hemmer Celecoxib und Rofecoxib die Bildung von Tumoren in Dünndarm, Brust, Lunge, Haut, Zunge und Blase unterdrücken [272-276]. Weiterhin verlangsamten sie das Wachstum bereits bestehender Geschwülste in verschiedenen Organen wie Kopf, Lunge, Brust, Dickdarm, Magen und Prostata [277]. Die entwickelten COX-2 Inhibitoren üben ihren antineoplastischen Effekt auf vielfältige Weise aus - sie hemmen die Angiogenese, lösen Apoptose aus und unterdrücken die Metastasenbildung. Allerdings zeigte sich bei regelmäßiger Einnahme der Inhibitoren über einen längeren Zeitraum ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Nebenwirkungen [278-279]. Weitere Wirkungen von NSAR betreffen vor allem den Gastrointestinaltrakt und die Nieren [106]. So kann die GFR durch COX-2-Inhibitoren beeinträchtigt werden [280]. Während der Schwangerschaft werden bei Mäusen und Ratten sowohl die Entwicklung des Cortex als auch die Größe der Glomeruli verändert [281]. Kontrovers wird im Schrifttum jedoch die Wirkung von NSAR während einer GN diskutiert. In einer experimentell induzierten GN vermehren NSAR die glomeruläre Produktion von Chemokinen wie MCP-1 [282]. Im Gegensatz dazu können NSAR bei einer GN mit nephrotischem Syndrom die Proteinurie reduzieren [283]. Zudem werden verschiedene COX-unabhängige Mechanismen diskutiert. So könnten die COX-Inhibitoren die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B oder des antiapoptotischen Proteins BCL-X_L verhindern. Auch könnten PPAR α und PPAR γ aktiviert oder die Bindungsaktivität von PPAR δ inhibiert werden [284]. In einer Zusammenschau der bisherigen Forschungsergebnisse ist der Einsatz von COX-2-Inhibitoren in der Prävention und Therapie von Karzinomen kritisch zu bewerten. Weitere Untersuchungen mit NSARs sind auf diesem Gebiet in Zukunft notwendig. Im Hinblick auf Erkrankungen der Niere ist es aber vielversprechend den SK/S1P/S1P-Rezeptorsignalweg weiter zu analysieren. Zudem ist es von Bedeutung den molekularen Mechanismus von S1P zu verstehen um Strategien für die Regulation von sowohl intra- als auch extrazellulären S1P-Konzentrationen zu entwickeln.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme SK-1 und COX-2 sowie das Molekül S1P wichtige Rollen innerhalb verschiedener Aspekte der Zellregulation einnehmen. Sie gehören zu vielversprechenden Angriffspunkten in der Therapie von Krebs sowie fibrotischen und entzündlichen Nierenerkrankungen.

5 Zusammenfassung

Bioaktive Sphingolipide spielen neben ihrer Funktion als strukturelle Membranbestandteile eine wichtige Rolle bei der Regulation entscheidender Prozesse in Mesangiumzellen. Im Fokus der derzeitigen Forschung steht S1P, weil es vielfältige physiologische und pathophysiologische Prozesse wie die Organisation des Zytoskelettes, die Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes, Proliferation, Migration, Adhäsion und Apoptose reguliert [70, 172, 185]. Zudem weisen zahlreiche Befunde der letzten Jahre darauf hin, dass eine Störung im Lipidstoffwechsels bei der Entstehung und Progression bedeutsamer Erkrankungen wie Krebs, Arteriosklerose, Asthma sowie verschiedener Nierenerkrankungen eine entscheidene Rolle spielen kann [172-173]. Daher lag das Ziel dieser Arbeit zum einen in der Untersuchung des Einflusses von PPAR γ -Agonisten auf den Sphingolipidstoffwechsel in glomerulären Mesangiumzellen und zum anderen in der funktionellen Analyse von extra- und intrazellulärem S1P für die Expression der COX-2 in renalen Mesangiumzellen, um so wertvolle und neue Erkenntnisse für die Behandlung von fibrotischen und entzündlichen Nierenerkrankungen zu gewinnen.

Es konnte gezeigt werden, dass die PPAR γ -Agonisten TRO und RSG in glomerulären Mesangiumzellen den Sphingolipidmetabolismus durch eine gesteigerte mRNA- und Proteinexpression der SK-1 beeinflussen können. Ebenso konnte eine gesteigerte Aktivität der SK-1 gemessen werden. Diese Effekte wiederum resultierten in erhöhten, intrazellulären S1P-Konzentrationen und verringerten Konzentrationen des profibrotischen Bindegewebswachstumsfaktors CTGF. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der Promotor der SK-1 durch TZDs aktivierbar ist und dass ein PPRE innerhalb der Promotorsequenz durch die Bindung von PPAR γ -Agonisten diese Aktivierung bewirkt. *In vivo* Experimente mit isolierten Glomeruli, die aus mit TRO und RSG behandelten Mäusen gewonnen wurden, zeigten ebenfalls eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression der SK-1. Die CTGF-Proteinexpression war nach Behandlung der Mäuse mit TZDs *in vivo* verringert. Zudem wurde gezeigt, dass der S1P₁-Rezeptor in Rattenmesangiumzellen durch PPAR γ -Agonisten reguliert werden kann. Dieser Effekt wurde durch eine Aktivierung des S1P₁-Rezeptor-Promotors mit einer nachfolgenden verstärkten mRNA- und Proteinexpression vermittelt. Ferner konnte gezeigt werden, dass der durch TZDs aktivierbare S1P₁-Rezeptor-Promotor durch ein PPRE innerhalb der Promotorsequenz angeregt wird.

Dem zweiten Teil dieser Arbeit lag die funktionelle Analyse von S1P auf die COX-2-Expression und dessen Signalweiterleitung in renalen Mesangiumzellen zugrunde. Durch die Verwendung von eS1P konnte gezeigt werden, dass die mRNA- und Proteinexpression der COX-2, nicht aber der COX-1, in Rattenmesangiumzellen dosisabhängig induziert werden konnte. Mit Hilfe von verschiedenen S1PR-Agonisten und Antagonisten sowie siRNA gegen den S1P₂-Rezeptor konnte in dieser Arbeit der S1P₂-Rezeptor als der verantwortliche Rezeptorsubtyp für die S1P-induzierte COX-2-Expression charakterisiert werden. Die weitere Signalweiterleitung erfolgte in Rattenmesangiumzellen G_{i/o}-gekoppelt über die Aktivierung der p42/p44 MAPK, da die spezifischen MEK1/2-Inhibitoren U0126 und PD 98059 die Proteinexpression der COX-2 herunter regulieren konnten. Auch die basalen PGE₂-Konzentrationen waren nach der Stimulation mit S1P erhöht und konnten durch die zusätzliche Verwendung von COX-2-induzierendem Ang II verstärkt werden. Außerdem resultierte die Behandlung von Rattenmesangiumzellen mit S1P, in Gegenwart des pro-entzündlichen Zytokins IL-1 β , in einer Steigerung der COX-2-Expression und führte funktionell zu einer erhöhten PGE₂-Biosynthese. Wesentlich zur vermehrten COX-2-Expression trägt die transkriptionelle Regulierung des Enzyms bei. Intrazelluläres S1P induzierte die COX-2-Expression in Mesangiumzellen der Ratte dosisabhängig. Auch in Mausmesangiumzellen, isoliert aus SK-1 defizienten Mäusen war die Expression der COX-2 signifikant erhöht was in Einklang mit einer signifikant erhöhten PGE₂-Biosynthese in Zellen aus SK-1 defizienten Mäusen stand.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass S1P sowie Sphingolipid- und eicosanoidmetabolisierende Enzyme interessante therapeutische Ansatzpunkte zur Behandlung von fibrotischen und entzündlichen Nierenerkrankungen sind.

6 Literatur

1. Futerman AH, Hannun YA (2004). *The complex life of simple sphingolipids*. EMBO Rep **5**: 777-82.
2. Spiegel S, Milstien S (2003). *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. Nat Rev Mol Cell Biol **4**: 397-407.
3. Merrill AH, Jr. (2002). *De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway*. J Biol Chem **277**: 25843-6.
4. Chen Y, et al. (2010). *An introduction to sphingolipid metabolism and analysis by new technologies*. Neuromolecular Med **12**: 306-19.
5. Merrill AH, Jr., Schmelz EM, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT, Voss KA, Wang E (1997). *Sphingolipids-the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology*. Toxicol Appl Pharmacol **142**: 208-225.
6. Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, Sandhoff K (2000). *Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling*. Biochim Biophys Acta **1485**: 63-99.
7. Sensken SC, Gräler MH (2009). *Sphingolipids and their medical impact*. Dtsch Med Wochenschr **134**: 259-263.
8. Fyrst H, Saba JD (2010). *An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators*. Nat Chem Biol **6**: 489-97.
9. Neumann S, van Meer G (2008). *Sphingolipid management by an orchestra of lipid transfer proteins*. Biol Chem **389**: 1349-60.
10. Merrill AH, Jr., Jones DD (1990). *An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism*. Biochim Biophys Acta **1044**: 1-12.
11. Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA (2002). *Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives*. Biochim Biophys Acta **1585**: 114-25.
12. Spiegel S, Merrill AH, Jr. (1996). *Sphingolipid metabolism and cell growth regulation*. FASEB J **10**: 1388-97.
13. Zhang H., et al. (1990). *Sphingosine stimulates cellular proliferation via a protein kinase C-independent pathway*. J Biol Chem **265**: 76-81.
14. Hannun YA (1996). *Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress*. Science **274**: 1855-1859.
15. Spiegel S, Foster D, Kolesnick R (1996). *Signal transduction through lipid second messengers*. Curr Opin Cell Biol **8**: 159-167.
16. Pena LA, Fuks Z, Kolesnick R (1997). *Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway*. Biochem Pharmacol **53**: 615-621.

17. Okazaki T, Bell RM, Hannun YA (1989). *Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation.* J Biol Chem **264**: 19076-19080.
18. Spiegel S, English D, Milstien S (2002). *Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction.* Trends Cell Biol **12**: 236-42.
19. Cuvillier O, Kleuser G, Vanek B, Coso PG, Gutkind OA, Spiegel S (1996). *Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate.* Nature **381**: 800-803.
20. Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S (2002). *Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis.* Biochim Biophys Acta **1585**: 193-201.
21. Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S (2006). *Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases.* Biochim Biophys Acta **1758**: 2016-2026
22. Taha TA, Hannun YA, Obeid LM (2006). *Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease.* J Biochem Mol Biol **39**: 113-131.
23. Stoffel W, Heimann G, Hellenbroich B (1973). *Sphingosine kinase in blood platelets.* Hoppe Seylers Z Physiol Chem **354**: 562-566.
24. Stoffel W, Hellenbroich B, Heimann G (1973). *Properties and specificities of sphingosine kinase from blood platelets.* Hoppe Seylers Z Physiol Chem **354**: 1311-1316.
25. Olivera A, Kohama T, Tu Z, Milstien S, Spiegel S (1998). *Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase.* J Biol Chem **273**: 12576-12583.
26. Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S (1998). *Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase.* J Biol Chem **273**: 23722-23728.
27. Melendez AJ, Carlos-Dias E, Gosink M, Allen JM, Takacs L (2000). *Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution.* Gene, **251**: 19-26.
28. Venkataraman K, Thangada S, Michaud J, Oo ML, Ai Y, Lee YM, Wu M, Parikh NS, Khan F, Proia RL, Hla T (1996). *Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular SIP gradient.* Biochem J **397**: 461-471.
29. Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, Milstien S, Kohama T, Spiegel S (2000). *Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform.* J Biol Chem **275**: 19513-19520.
30. Kihara A, Anada Y, Igarashi Y (2006). *Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization.* J Biol Chem **281**: 4532-4539.
31. Hannun YA, Luberto C, Argraves KM (2001). *Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling.* Biochemistry **40**: 4893-4903.

32. Sato M, Markiewicz M, Yamanaka M, Bielawska A, Mao C, Obeid LM, Hannun YA, Trojanowska M (2003). *Modulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by endogenous sphingolipid mediators*. J Biol Chem **278**: 9276-9282.
33. Pitson SM, Moretti PA, Zebol JR, Zareie R, Derian CK, Darrow AL, Qi J, D'Andrea RJ, Bagley CJ, Vadas MA, Wattenberg BW (2002). *The nucleotidebinding site of human sphingosine kinase 1*. J Biol Chem **277**: 49545-49553.
34. Spiegel S, Milstien S (2003). *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. Nat Rev Mol Cell Biol **4**: 397-407 .
35. Allende ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, Echten-Deckert G, Hajdu R, Rosenbach M, Keohane CA, Mandala S, Spiegel S, Proia RL (2004). *Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720*. J Biol Chem **279**: 52487-52492.
36. Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Mille, GF, Spiegel S, Proia, RL (2005). *Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development*. Mol Cell Biol **25**: 11113-11121.
37. Ding G, Sonoda H, Yu H, Kajimoto T, Goparaju SK, Jahangeer S, Okada T, Nakamura T. (2007). *Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2*. J. Biol. Chem **282**: 27493-27502.
38. Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, Nava VE, Sankala H, Payne SG, Bektas M, Ishii I, Chun J, Milstien S, Spiegel S (2003). *Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis*. J. Biol. Chem. **278**:40330-40336.
39. Hofmann LP, Ren S, Schwalm S, Pfeilschifter J, Huwiler A (2008). *Sphingosine kinase 1 and 2 regulate the capacity of mesangial cells to resist apoptotic stimuli in an opposing manner*. Biol Chem **389**: 1399-1407.
40. Imamura T, Ohgane J, Ito S, Ogawa T, Hattori N, Tanaka S, Shiota K (2001). *CpG island of rat sphingosine kinase-1 gene: tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons*. Genomics **76**: 117-125.
41. Imamura T, Miyauchi-Senda N, Tanaka S, Shiota K (2004). *Identification of genetic and epigenetic similarities of SPHK1/Sphk1 in mammals*. J Vet Med Sci **66**(11): 1387-1393.
42. Billich A, Bornancin F, Devay P, Mechtcheriakova D, Urtz N, Baumruker T (2003). *Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases*. J Biol Chem **278**: 47408-47415.
43. Alemany R, van Koppen CJ, Danneberg K, ter Braak M, Meyer zu Heringdorf D (2007). *Regulation and functional roles of sphingosine kinases*. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol **374**:413-428.
44. Meyer zu Heringdor D (2004). *Lysophospholipid receptor-dependent and -independent calcium signaling*. J Cell Biochem **92**: 937-948.

45. Pitson SM (2011). *Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling*. Trends Biochem. Sci **36**:97-107.
46. Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, Maceyka M, Jiang H, Luo C, Kordula T, Milstien S, Spiegel S (2010). *Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2*. Natur **465**:1084-1088.
47. French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly LJ, Yun JK, Smith CD (2003). *Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase*. Cancer Res **63**:5962-5969.
48. Igarashi Y (1997). *Functional roles of sphingosine, sphingosine 1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signaling pathways*. J Biochem **122**, 1080-1087.
49. Igarashi Y, Sadahira Y, Yamamura S, Hakomori S (1997). *Inhibition of mouse B16 melanoma cell motility by sphingosine-1-phosphate*. Adv Exp Med Biol **400B**: 693-698.
50. Goetzl EJ, An S (1998). *Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate*. Faseb J **12**: 1589-1598.
51. Hla T. (2001). *Sphingosine 1-phosphate receptors*. Prostaglandins. **64**: 135-142.
52. Balthasar S, Samulin J, Ahlgren H, Bergelin N, Lundqvist M, Toescu EC, Eggo MC, Tornquist K (2006). *Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile and regulation of migration in human thyroid cancer cells*. Biochem J **398**: 547-556.
53. Takuwa Y (2002). *Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors*. Biochim Biophys Acta **1582**: 112-120.
54. Malchinkhuu E, Sato K, Horiuchi Y, Mogi C, Ohwada S, Ishiuchi S, Saito N, Kurose H, Tomura H, Okajima F (2005). *Role of p38 mitogen-activated kinase and c-Jun terminal kinase in migration response to lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in glioma cells*. Oncogene **24**: 6676-6688.
55. Yamaguchi H, Kitayama J, Takuwa N, Arikawa K, Inoki I, Takehara K, Nagawa H, Takuwa Y (2003). *Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells*. Biochem J **374**: 715-722.
56. Czeloth N, Bernhardt G, Hofmann F, Genth H, Forster R (2005). *Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells*. J Immunol **175**: 2960-2967.
57. Ogretmen B, Hannun YA (2004). *Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment*. Nat Rev Cancer **4**: 604-616.
58. Saba JD, Hla T (2004). *Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism*. Circ. Res **94**: 724-34.

59. Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, Asazuma N, Satoh K, Ozaki Y, Kume S (1997). *Sphingosine-1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum*. J. Biochem **121**:969-973.
60. Tani M, Ito M, Igarashi Y (2007). *Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space*. Cell. Signal. **19**: 229-37.
61. Kluk MJ, Hla T (2002). *Signaling of sphingosine-1-phosphate via the SIP/EDGfamily of G-protein-coupled receptors*. Biochim. Biophys. Acta **1582**: 72-80.
62. Olivera A, Spiegel, S (1993). *Sphingosine 1 phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens*. Nature **365**: 557-560.
64. Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, Luo C, Marmorstein R, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. (2009). *Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate*. Science **325**:1254-1257.
65. Strub GM, Paillard M, Liang J, Gomez L, Allegood JC, Hait NC, Maceyka M, Price MM, Chen Q, Simpson DC, Kordula T, Milstien S, Lesnefsky EJ, Spiegel S (2011). *Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration*. FASEB J **25**: 600-612.
66. Li MH, Sanchez T, Pappalardo A, Lynch KR, Hla T, Ferrer F (2008). *Induction of antiproliferative connective tissue growth factor expression in Wilms' tumor cells by sphingosine-1-phosphate receptor 2*. Mol Cancer Res **6**: 1649-1656.
67. Ren S, Babelova A, Moreth K, Xin C, Eberhardt W, Doller A, Pavenstädt H, Schaefer L, Pfeilschifter J, Huwiler A (2009). *Transforming growth factor-beta2 upregulates sphingosine kinase-1 activity, which in turn attenuates the fibrotic response to TGF-beta2 by impeding CTGF-Expression*. Kidney Int **76**: 857-867.
68. Gennero I, Fauvel J, Nieto M, Cariven C, Gaits F, Briand-Mésange F (2002). *Apoptotic effect of sphingosine 1-phosphate and increased sphingosine 1-phosphate hydrolysis on mesangial cells cultured at low cell density*. J Biol Chem **277**: 12724-12734.
69. Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. Pharmacol. Rev **62**: 579-587.
70. Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH (2007). *Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism*. Biochim. Biophys. Acta **1768**: 923-940.
71. Brinkmann V (2007). *Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology*. Pharmacol Ther **115**: 84-105.
72. Skoura A, Hla T (2009a). *Lysophospholipid receptors in vertebrate development, physiology, and pathology*. J. Lipid Res **50**: 293-298.

73. Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, Lidington D, Bolz SS, Friedman TB, Hla T, Proia RL (2007). *Deafness and stria vascularis defects in SIP2 receptor-null mice*. J. Biol. Chem **282**: 10690-10696.
74. Salomone S, Potts EM, Tyndall S, Ip PC, Chun J, Brinkmann V, Waeber C (2008). *Analysis of sphingosine-1-phosphate receptors involved in constriction of isolated cerebral arteries with receptor null mice and pharmacological tools*. Br. J. Pharmacol. **153**: 140-147.
75. Golfier S, Kondo S, Schulze T, Takeuchi T, Vassileva G, Achtman AH, Gräler MH, Abbondanzo SJ, Wiekowski M, Kremmer E, Endo Y, Lira SA, Bacon KB, Lipp M (2010). *Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor SIP4*. FASEB J **24**: 4701-4710.
76. Wang W, Gräler MH, Goetzl EJ (2005). *Type 4 sphingosine-1-phosphate G protein-coupled receptor (SIP4) transduces SIP effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration*. FASEB J **19**: 1731-1733.
77. Jenne CN et al. (2009). *T-bet-dependent SIP5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow*. J. Exp. Med **206**: 2469-2481.
78. Novgorodov AS, El-Alwani M, Bielawski J, Obeid LM, Gudz TI (2007). *Activation of Sphingosine 1-phosphate receptor SIP5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration*. Faseb J **21**: 1503-1514.
79. Remuzzi G, Bertani T (1998). *Pathophysiology of progressive nephropathies*. N Engl J Med, **20**: 1448-1456.
80. Pfeilschifter J, Kunz D, Mühl H (1993). *Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells*. Nephron **64**: 518-525.
81. Pfeilschifter, J (1994). *Mesangial cells orchestrate inflammation in the renal glomerulus*. News Physiol Sci **9**: 271-276.
82. Anderson PW, McGill JB, Tuttle KR (2007). *Protein kinase C beta inhibition: the promise for treatment of diabetic nephropathy*. Curr Opin Nephrol Hypertens **16**: 397-402.
83. Wolf G (2006). *Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway*. Kidney Int **70**: 1914-1919.
84. Geoffroy K, Troncy L, Wiernsperger N, Lagarde M, El Bawab S (2005). *Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels*. FEBS Lett **579**: 1249-1254.
85. Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratziu V, Bedossa P (1999). *Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis*. Hepatology **30**: 968-976.
86. Wynn T (2008). *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol **214**: 199-210.

87. Byung Ha Chung, Lim SW, Ahn KO, Sugawara A, Ito S, Choi BS, Kim YS, Bang BK, Yang CW (2005). *Protective effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists on diabetic and non-diabetic renal diseases.* Nephrology **10**: 40-43
88. Issemann I, Green S (1990). *Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators.* Nature **347**: 645-650.
89. Komar MC (2005). *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling.* Biol Endocrinol **3**: 41.
90. Varga T, Nagy L (2008). *Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: the case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.* Eur J Clin Invest **38**: 695-707.
91. Desvergne B, Wahli W (1999). *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.* Endocr Rev **20**: 649-688.
92. Peraza MA, Burdick AD, Marin HE, Gonzalez FJ, Peters JM (2006). *The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR).* Toxicol Sci. **90**: 269-95.
93. Escher P, Wahli W (2000). *Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions.* Mutat Res **448**: 121-138.
94. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2006). *Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis.* J Clin Invest **116**: 571-580.
95. Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2003). *Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation.* Steroid Biochem Mol Biol **85**: 267-73.
96. Gelman L, Auwerx J (1999). *Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of a fast food impact on gene regulation.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care **2**: 307-12.
97. Hihi AK, Michalik L, Wahli W (2002). *PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives.* Cell Mol Life Sci **59**: 790-798.
98. Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2004). *Peroxisome proliferator-activated receptor-beta as a target for wound healing drugs.* Expert Opin Ther Targets. **8**: 39-48.
99. Lim H, Gupta RA, Ma W, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK (1999). *Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta.* Gene Dev **13**: 1561.
100. Ren S, Xin C, Beck KF, Saleem MA, Mathieson P, Pavenstädt H, Pfeilschifter J, Huwiler A (2005). *PPARalpha activation upregulates nephrin expression in human embryonic kidney epithelial cells and podocytes by a dual mechanism.* Biochem Biophys Res Commun **338**: 1818-1824

101. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV (1998). *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. *Nature* **39**: 137-43.
102. Venkatachalam G, Kumar AP, Yue LS, Pervaiz S, Clement MV, Sakharkar MK (2009). *Computational identification and experimental validation of PPRE motifs in NHE1 and MnSOD genes of human*. *BMC Genomics* **10**:1471-2164.
103. Tolman KG (2000). *Thiazolidinedione hepatotoxicity: a class effect?* *Int J Clin Pract Suppl* **113**: 29-34.
104. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Boström P, Laznik D, Ruas JL, Chalmers MJ, Kamenecka TM, Blüher M, Griffin PR, Spiegelman BM (2010). *Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5*. *Nature* **466**: 451-456.
105. Houtkooper RH, Auwerx J (2010). *Obesity: New life for antidiabetic drugs*. *Nature* **466**: 443-444.
106. Nissen SE, Wolski K (2007). *Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes*. *N Engl J Med* **356**: 2457-2471.
107. Wu J, Chen L, Zhang D, Huo M, Zhang X, Pu D, Guan Y (2009). *Peroxisome proliferator activated receptors and renal diseases*. *Front Biosci* **14**: 995-1009.
108. Thomas MC, Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C (2012). *The Renoprotective Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Agonists in Diabetes*. *PPAR Research* **2012**: 1-10
109. Gambaro G (2003). *Adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors*. *J Intern Med* **253**: 643-652.
110. Flower RJ (2009). *Prostaglandins, bioassay and inflammation*. *BJP* **147**: 182-197.
111. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993). *Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids*. *Neuron* **11**: 371-386.
112. Schaloske RH, Dennis EA (2006). *The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system*. *Biochim Biophys Acta* **1761**: 1246-59.
113. Smith WL (1992). *Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action*. *Am J Physiol* **263**: 181-191.
114. Nasrallah R, Hébert RL (2005). *Prostacyclin signalling in the kidney: implications for health and disease*. *AJP-Reanl Physiol* **289**: 235-246.
115. Funk CD (2001). *Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology*. *Science* **294**: 1871-1875.
116. Schuster VL (1998). *Molecular mechanism ofprostaglandin transport*. *Annu Rev Physiol* **60**: 221-242

117. Gupta RA, Dubois RN (2001). *Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2*. Nat Rev Cancer **1**: 11-21.
118. FitzGerald GA (2003). *COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease*. Nat Rev Drug Discov **2**: 879-90.
119. Bonvalet JP, Pradelles P, and Farman N (1987). *Segmental synthesis and actions of prostaglandins along the nephron*. Am J Physiol **253**: 377-387.
120. Peskar BM (2001). *Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense*. J Physiol Pharmacol. **52**: 555-68.
121. Stork JE, Rahman MA, Dunn MJ (1986): *Eicosanoids in experimental and human renal disease*. Am J Med **80** Suppl. 1A: 34-45.
122. Lianos EA, Bresnahan BA (1999): *Effect of thromboxane A2 inhibition and antagonism on prostaglandin and leukotriene synthesis in glomerular immune injury*. J Lab Clin Med **134**: 478-483.
123. Uriu K, Kaizu K, Hashimoto O, Komine N, Etho S (1994): *Acute and chronic effects of thromboxane A2 inhibition on the renal hemodynamics in streptozotocin-induced diabetic rats*. Kidney Int **45**: 794-802.
124. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM (1995): *Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II*. Nature **378**: 406-409.
125. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 8. Auflage 2001.
126. Hemler M, Lands WE (1976). *Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins: demonstration of two forms of iron in the holoenzyme*. J Biol Chem **251**: 5575-5579.
127. van der Ouderaa FJ, Buytenhek M, Nugteren DH, and Van Dorp DA (1977). *Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands*. Biochim Biophys Acta **487**: 315-333.
128. Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, and Hayaishi O (1976). *Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes*. J Biol Chem **251**: 2629-2636.
129. Ogino N, Ohki S, Yamamoto S, and Hayaishi O (1978). *Prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes: inactivation and activation by heme and other metalloporphyrins*. J Biol Chem **253**: 5061-5068.
130. DeWitt DL, Smith WL (1988). *Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence*. Proc Natl Acad Sci USA **85**: 1412-1416.

131. Yokoyama C, Takai T, and Tanabe T (1988). *Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence*. FEBS Lett **231**: 247-251.
132. Merlie JP, Fagan D, Mudd J, and Needleman P (1988). *Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)*. J Biol Chem **263**: 3550-3553.
133. Flower RJ and Vane JR (1972). *Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol)*. Nature **240**: 410-411.
134. Smith WL and Lands WE (1972). *Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland*. Biochemistry **11**: 3276-3285.
135. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, and Simmons DL (1991). *Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing*. Proc Natl Acad Sci USA **88**: 2692-2696.
136. O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V, and Young DA (1991). *A serum- and glucocorticoid- regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein*. J Biol Chem **266**: 23261-23267.
137. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002). *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression*. Proc Natl Acad Sci USA **99**: 13926-13931.
138. Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004). *Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition*, Pharmacol Rev **56**: 387-437.
139. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW (1993). *Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues*. FEBS Lett. **330**: 156-160.
140. Kitano M, Hla T, Sekiguchi M, Kawahito Y, Yoshimura R, Miyazawa K, Iwasaki T, Sano H (2006). *Sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in rheumatoid synovium: regulation of synovial proliferation and inflammatory gene expression*. Arthritis Rheum **54**: 742-753.
141. Li MH, Sanchez T, Milne GL, Morrow JD, Hla T, Ferrer F (2009). *S1P/S1P2 signaling induces cyclooxygenase-2 expression in Wilms tumor*. J. Urol. **181**: 1347-1352.
142. Kim JI, Jo EJ, Lee HY, Cha MS, Min JK, Choi CH, Lee YM, Choi YA, Baek SH, Ryu SH, Lee KS, Kwak YK, Bae YS (2003). *Sphingosine 1-phosphate in amniotic fluid modulates cyclooxygenase-2 expression in human amnion-derived WISH cells*. J. Biol. Chem. **278**: 31731-31736.
143. Nodai A, Machida T, Izumi S, Hamaya Y, Kohno T, Igarashi Y, Iizuka K, Minami M, Hirafuji M (2007). *Sphingosine 1-phosphate induces cyclooxygenase-2 via Ca²⁺-dependent, but MAPK-independent mechanism in rat vascular smooth muscle cells*. Life Sci. **80**: 1768-1776.

144. Herschman HR, Reddy ST, Xie W. (1997) *Function and regulation of prostaglandin synthase-2*. Adv Exp Med Biol **407**: 61-66.
145. Turini ME, DuBois RN (2002). *Cyclooxygenase-2: a therapeutic target*. Annu. Rev. Med. **53**: 35-57.
146. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, DuBois RN, Breyer MD. (1994). *Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction*. J Clin Invest **94**: 2504-2510.
147. Ferguson S, Hébert RL, Laneuville O (1999). *NS-398 upregulates constitutive cyclooxygenase-2 expression in the M-1 cortical collecting duct cell line*. J Am Soc Nephrol. **10**: 2261-71.
148. Smith WL, De Witt DL, Garavito RM (2000). *Cyclooxygenases: Structural, Cellular and Molecular Biology*. Annu Rev Biochem **69**: 145-182.
149. Hla T, Neilson K (1989). *Human cyclooxygenase-2 cDNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **89**: 7384-7388.
150. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Hershman HR (1991): *TIS10, a phorbol ester tumor promoterinducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue*. Journal of Biological Chemistry **266**: 12866-12872.
151. Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004). *Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition*. Pharmacol Rev **56**: 387-437.
152. Fosslien E (2000). *Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia*. Ann Clin Lab Sci **30**: 3-21.
153. Billich A, Bornancin F, Mechtcheriakova D, Natt F, Huesken D, Baumruker T (2005). *Basal and induced sphingosine kinase 1 activity in A549 carcinoma cells: function in cell survival and IL-1beta and TNF-alpha induced production of inflammatory mediators*. Cell Signal **17**: 1203-1217.
154. Chun KS, Surh YJ (2004). *Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention*. Biochem Pharmacol, **68**: 1089-1100.
155. Zhang GS, Liu DS, Dai CW, Li RJ (2006). *Antitumor effects of celecoxib on K562 leukemia cells are mediated by cell-cycle arrest, caspase-3 activation, and downregulation of COX-2-Expression and are synergistic with hydroxyurea or imatinib*. Am J Hematol, **81**: 242-255.
156. Skoura A, Sanchez T, Claffey K, Mandala SM, Proia RL, Hla T (2007). *Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina*. J. Clin. Invest. **117**: 2506-2516.

157. Ikeda Y, Ohashi K, Shibata R, Pimentel DR, Kihara S, Ouchi N, Walsh K (2008). *Cyclooxygenase-2 induction by adiponectin is regulated by a sphingosine kinase-1 dependent mechanism in cardiac myocytes*. FEBS Lett. **582**: 1147-1150.
158. Roux PP, Blenis J (2004). *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68**: 320-44.
159. Miura S, Tanigawa H, Matsuo Y, Fujino M, Kawamura A, Saku K (2003). *Ras/Raf1-dependent signal in sphingosine-1-phosphate-induced tube formation in human coronary artery endothelial cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun **306**: 924-9.
160. Chang MS, Chen BC, Yu MT, Sheu JR, Chen TF, Lin CH (2005). *Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways*. Cell Signal **17**: 299-310.
161. Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. (2003). *MAPK pathways in radiation responses*. Oncogene **22**: 5885-5896.
162. Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999). *Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons*. Science **286**: 2358-2361.
163. Mohan C. (2009): *Signal Transduction. A Short Overview of Its Role in Health and Disease. MAP Kinase Signaling: Synergistic Response to Upstream Signals*. EMD Chemicals San Diego, California Merck. 1-147.
164. Zarubin T, Han J (2005). *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. Cell Res **15**: 11-18.
165. Cuadrado A, Nebreda AR (2010). *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. Biochem J. **429**: 403-417.
166. Zhang W, Liu HT (2002). *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res **12**: 9-18.
167. Arthur JS (2008). *MSK activation and physiological roles*. Front Biosci **13**: 5866-5879.
168. Shi Y, Gaestel M (2002). *In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance*. Biol Chem **383**: 1519-1536.
169. Nishina H, Wada T, Katada T (2004). *Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway*. J Biochem **136**: 123-126.
170. Su B, Karin M (1996). *Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression*. Curr Opin Immunol **8**: 402-411.
171. Davis RJ (1999). *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase*. Biochem Soc Symp **64**: 1-12.
172. Pyne NJ, Pyne S (2010). *Sphingosine-1-phosphate and cancer*. Nat. Rev. Cancer **10**: 489-503.

173. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S (2008). *Inside-out signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets*. Pharmacol. Rev **60**: 181-195.
174. Imasawa T, Kitamura H, Ohkawa R, Satoh Y, Miyashita A, Yatomi Y (2010). *Unbalanced expression of sphingosine-1-phosphate receptors in diabetic nephropathy*. Exp Toxicol Pathol **62**: 53-60.
175. Lan T, Liu W, Xie X, Xu S, Huang K, Peng J, Shen X, Liu P, Wang L, Xia P, Huang H (2011). *Sphingosine kinase-1 pathway mediates high glucose-induced fibroectin expression in glomerular mesangial cells*. Mol Endocrinol **25**: 2094-2105.
176. Wenderfer SE, Stepkowski SM, Braun MC (2008). *Increased survival and reduced renal injury in MRL/lpr mice treated with a novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist*. Kidney Int **74**: 1319-1326.
177. Hsieh HL, Wu CB, Sun CC, Liao CH, Lau YT, Yang CM (2006). *Sphingosine-1-phosphate induces COX-2-Expression via PI3K/Akt and p42/p44 MAPK pathways in rat vascular smooth muscle cells*. J. Cell. Physiol **207**: 757-766.
178. Sarafidis, Bakris (2006). *Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside*. Kidney Int. **70**: 1223-1233.
179. Iglesias, Diez (2006). *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in renal disease*. Eur. J. Endocrinol. **154**: 613-621.
180. Ma LJ, Marcantoni C, Linton MF, Fazio S, Fogo AB (2001). *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone protects against nondiabetic glomerulosclerosis in rats*. Kidney Int **59**: 1899-1910.
181. Hirose S, Yamamoto T, Feng L, Yaoita E, Kawasaki K, Goto S, Fujinaka H, Wilson CB, Arakawa M, Kihara I (1998). *Expression and localization of cyclooxygenase isoforms and cytosolic phospholipase A2 in anti-Thy-1 glomerulonephritis*. J. Am. Soc. Nephrol. **9**: 408-416.
182. Murayama T, Ui M (1983). *Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes*. J Biol Chem **258**: 3319-26.
183. Obinata H, Hla T (2012). *Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation*. Semin Immunopathol **34**: 73-91.
184. Ohama T, Okada M, Murata T, Brautigan DL, Hori M, Ozaki H (2008). *Sphingosine-1-phosphate enhances IL-1{beta}-induced COX-2-Expression in mouse intestinal subepithelial myofibroblasts*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol **295**: 766-775.
185. Rivera R, Chun J (2008). *Biological effects of lysophospholipids*. Rev Physiol Biochem Pharmacol. **160**: 25-46.
186. Wu J, Chen L, Zhang D, Huo M, Zhang X, Pu D et al. (2009). *Peroxisome proliferator-activated receptors and renal diseases*. Front Biosci **14**: 995-1009.

187. Long DA, Price KL (2009). *Sphingosine kinase-1: a potential mediator of renal fibrosis*. *Kidney Int* **76**: 815-817.
188. Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, Hoyle GW, Corti M, Athas G, Lungarella G, Brody A, Friedman M (1998). *Connective tissue growth factor mRNA-Expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis*. *Am J Physiol* **275**: 365-71.
189. Paradis, V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratziu V, Bedossa P (1999). *Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis*. *Hepatology* **30**: 968-76.
190. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR (1993). *Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair*. *Mol Biol Cell* **4**: 637-45.
191. Boor P, Sebeková K, Ostendorf T, Floege J (2007). *Treatment targets in renal fibrosis*. *Nephrol Dial Transplant* **22**: 3391-407
192. Isshiki K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, Kikkawa R (2000). *Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats*. *Diabetes* **49**: 1022-1032.
193. Ma LJ, Marcantoni C, Linton MF, Fazio S, Fogo AB (2001). *Peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonist troglitazone protects against nondiabetic glomerulosclerosis in rats*. *Kidney Int* **59**: 1899-1910.
194. Kadegowda AK, Khanb JM, Piperova LS, Teter BB, Rodriguez-Zas SL, Erdman RA, Lorb JJ (2013). *Trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid-induced milkfat depression is associated with inhibition of PPAR γ signalling and inflammation in murine mammary tissue*. *J. Lipids* (Manuskript).
195. Nakade Y, Banno Y, Koizumi K, Hagiwara K, Sobue S, Koda M, Suzuki M, Kojima T, Takagi A, Asano H, Nozawa Y, Murate T (2003). *Regulation of sphingosine kinase 1 gene expression by protein kinase C in a human leukemia cell line, MEG-O1*. *Biochim Biophys Acta* **1635**: 104-116.
196. Koch A, Völzke A, Wünsche C, Meyer Zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2012). *Thiazolidinedione dependent activation of sphingosine kinase 1 causes an anti-fibrotic effect in renal mesangial cells*. *Br J Pharmacol* **166**: 1018-1032.
197. Feinstein DL, et al. (2005). *Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key?* *Biochem Pharmacol* **70**: 177-188.
198. Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM (1996). *The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones*. *J Med Chem* **39**: 665-8.

199. Whiteside C, Wang H, Xia L, Munk S, Goldberg HJ, Fantus IG (2009). *Rosiglitazone prevents high glucose-induced vascular endothelial growth factor and collagen IV expression in cultured mesangial cells*. Exp Diabetes Res. **2009**: 1-11
200. Yu HN, Lee YR, Noh EM, Lee KS, Kim JS, Song EK, Han MK, Lee YC, Kwon KB, Lee SJ, Youn HJ, Jung SH (2008). *Induction of G1 phase arrest and apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells by troglitazone, a synthetic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand*. Cell Biology International **32**: 906-912.
201. Hwang JT, Kim SH, Lee MS, Kim SH, Yang HJ, Kim MJ, Kim HS, Ha J, Kim MS, Kwon DY. (2007). *Anti-obesity effects of ginsenoside Rh2 are associated with the activation of AMPK signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte*. Biochemical and Biophysical Research Communications **364**: 1002-1008.
202. Kawai T, Masaki T, Doi S, Arakawa T, Yokoyama Y, Doi T, Kohno N, Yorioka N (2009). *PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF beta*. Lab Invest **89**: 47-58.
203. Wang W, Liu F, Chen N (2007). *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) agonists attenuate the profibrotic response induced by TGF-beta1 in renal interstitial fibroblasts*. Mediators Inflamm **2007**: 1-7.
204. Xin C, Ren S, Kleuser B, Shabahang S, Eberhardt W, Radeke H, et al (2004). *Sphingosine 1-phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor beta-induced cell responses*. J Biol Chem **279**: 35255-35262.
205. Wang L, Xing XP, Holmes A, Wadham C, Gamble JR, Vadas MA, Xia P (2005). *Activation of the sphingosine kinase signaling pathway by high glucose mediates the proinflammatory phenotype of endothelial cells*. Circ Res **97**: 891-899
206. Geoffroy K, Troncy L, Wiernsperger N, Lagarde M, El Bawab S (2005). *Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels*. FEBS Lett **579**: 1249-1254.
207. Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR (2000). *Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis*. Kidney Int **58**: 1389-1399.
208. French KJ, Upson JJ, Keller SN, Zhuang Y, Yun JK, Smith CD (2006). *Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors*. J Pharmacol Exp Ther **318**: 596-603.
209. Lehrke M, Lazar MA (2005). *The many faces of PPARgamma*. Cell **123**: 993-999.
210. Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, Doi T (2008). *The Role of PPARs in Cancer*. PPAR Res **2008**: 1-15.

211. Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Furchart JC, Geboes K et al. (1998). *Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC^{min/+} mice*. *Natur Med* **4**: 1053-1057.
212. Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM et al. (1998). *Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation*. *Nature Med* **4**: 1058-1061.
213. Chien W, Yin D, Gui D, Mori A, Frank JM, Said J, Kusuanco D, Marchevsky A, McKenna R, Koeffler HP (2006). *Suppression of cell proliferation and signaling transduction by connective tissue growth factor in non-small cell lung cancer cells*. *Mol Cancer Res* **4**: 591-598.
214. Dornhofer N, Spong S, Bennewith K, Salim A, Klaus S, Kambham N et al. (2006). *Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis*. *Cancer Res* **66**: 5816-5827.
215. Sanchez T, Hla T (2004). *Structural and functional characteristics of SIP receptors*. *J Cell Biochem* **92**: 913-922.
216. Katsuma S, Hada Y, Ueda T, Shiojima S, Hirasawa A, Tanoue A, Takagaki K, Ohgi T, Yano J, Tsujimoto G (2002). *Signalling mechanisms in sphingosine 1-phosphate-promoted mesangial cell proliferation*. *Genes Cells* **7**: 1217-1230.
217. Hla T, Maciag T (1990). *An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein coupled receptors*. *J Biol Chem* **265**: 9308-9313.
218. Liu CH, Hla T (1997). *The mouse gene for the inducible G-Protein-coupled receptor EDG-1*. *Genomics* **43**: 15-24.
219. Pyne NJ, Tonelli F, Lim KG, Long JS, Edwards J, Pyne S (2012). *Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer*. *Biochem Soc Trans* **40**: 94-100.
220. Birker-Robaczewska M, Studer R, Haenig B, Menyhart K, Hofmann S, Nayler O (2008). *bFGF induces SIP1 receptor expression and functionality in human pulmonary artery smooth muscle cells*. *J Cell Biochem* **105**: 1139-1145.
221. Igarashi J, Erwin PA, Dantas AP, Chen H, Michel T (2003). *VEGF induces SIP1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10664-10669.
222. Yang J, Zhou Y, Guan Y (2012). *PPAR γ as a therapeutic target in diabetic nephropathy and other renal diseases*. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **21**: 97-105.
223. Park WS, Kim M, Kim M, D'Agati VD, Lee HT (2011). *Sphingosine kinase 1 protects against renal ischemia-reperfusion injury in mice by sphingosine-1-phosphate receptor activation*. *Kidney Int* **80**: 1315-1327.

224. Pfeilschifter J (1994). *Mesangial cells orchestrate inflammation in the renal glomerulus*. News Physiol. Sci. **9**: 271-276.
225. Pfeilschifter J (1989). *Cross-talk between transmembrane signaling systems: a prerequisite for the delicate regulation of glomerular haemodynamics by mesangial cells*. Eur. J. Clin. Invest **19**: 347-361.
226. Hirose S, Yamamoto T, Feng L, Yaoita E, Kawasaki K, Goto S, Fujinaka H, Wilson CB, Arakawa M, Kihara I (1998). *Expression and localization of cyclooxygenase isoforms and cytosolic phospholipase A2 in anti-Thy-1 glomerulonephritis*. J. Am. Soc. Nephrol. **9**: 408-416.
227. Tomasoni S, Noris M, Zappella S, Gotti E, Casiraghi F, Bonazzola S, Benigni A, Remuzzi G (1998). *Upregulation of renal and systemic cyclooxygenase-2 in patients with active lupus nephritis*. J. Am. Soc. Nephrol **9**: 1202-1212.
228. Kim JI, Jo EJ, Lee HY, Cha MS, Min JK, Choi CH, Lee YM, Choi YA, Baek S, Ryu SH, Lee KS, Kwak JY, Bae YS (2003). *Sphingosine 1-phosphate in amniotic fluid modulates cyclooxygenase-2 expression in human amnion-derived WISH cells*. J. Biol. Chem **278**: 31731-31736.
229. Lepley D, Paik JH, Hla T, Ferrer F (2005). *The G Protein-Coupled Receptor SIP2 Regulates Rho/Rho Kinase Pathway to Inhibit Tumor Cell Migration*. Cancer Res **65**: 3788-3795.
230. S. Salomone, C. Waeber (2011). *Selectivity and specificity of sphingosine-1-phosphate receptor ligands: caveats and critical thinking in characterizing receptor-mediated effects*. Front. Pharmacol. **2**: 1-9.
231. Dragusin M, Wehner S, Kelly S, Wang E, Merrill AH Jr., Kalf J, van Echten-Deckert G (2006). *Effects of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate on rat intestinal smooth muscle cells: implications for postoperative ileus*. FASEB J **20**: 1930-1932.
232. Kimura T, Sato K, Kuwabara A, Tomura H, Ishiwara M, Kobayashi I, Ui M, Okajima F (2001). *Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells*. J Biol Chem **276**: 31780-5.
233. Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N (2002). *Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII*. J. Biol. Chem **277**: 23747-23754.
234. Kim JH, Song WK, Chun JS (2000). *Sphingosine 1-phosphate activates Erk-1/2 by transactivating epidermal growth factor receptor in rat-2 cells*. IUBMB Life **50**: 119-24.

235. LaPointe MC, Isenovic E (1999). *Interleukin-1b Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 Involves the p42/44 and p38 MAPK Signaling Pathways in Cardiac Myocytes*. *Hypertension* **33**: 276-282.
236. Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, Nava VE, Sankala H, Payne SG, Bektas M, Ishii I, Chun J, Milstien S, Spiegel S (2003). *Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis*. *J Biol Chem* **278**(41):40330-6.
237. Hartner A, Pahl A, Brune K, Goppelt-Struebe M (2000). *Upregulation of cyclooxygenase-1 and the PGE2 receptor EP2 in rat and human mesangioproliferative glomerulonephritis*. *Inflamm Res* **49**: 345-54.
238. Johann AM, Weigert A, Eberhardt W, Kuhn AM, Barra V, von Knethen A, Pfeilschifter JM, Brüne B (2008). *Apoptotic cell-derived sphingosine-1-phosphate promotes HuR-dependent cyclooxygenase-2 mRNA stabilization and protein expression*. *J. Immunol* **180**: 1239-1248.
239. Schalkwijk CG, de Vet E, Pfeilschifter J, van den Bosch H (1992). *Interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta 2 enhance cytosolic high-molecular-mass phospholipase A2 activity and induce prostaglandin E2 formation in rat mesangial cells*. *Eur. J. Biochem* **210**: 169-176.
240. Pfeilschifter J, Schalkwijk C, Briner VA, van den Bosch H (1993). *Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A2 by rat mesangial cells. Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by cultured rat glomerular cells*. *J. Clin. Invest.* **92**: 2516-2523.
241. Payne SG, Oskeritzian CA, Griffiths R, Subramanian P, Barbour SE, Chalfant CE, Milstien S, Spiegel S (2007). *The immunosuppressant drug FTY720 inhibits cytosolic phospholipase A2 independently of sphingosine-1-phosphate receptors*. *Blood* **109**: 1077-1085.
242. Chen LY, Woszczek G, Nagineni S, Logun C, Shelhamer JH (2008). *Cytosolic phospholipase A2alpha activation induced by SIP is mediated by the SIP3 receptor in lung epithelial cells*. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol* **295**: 326-335.
243. Pfeilschifter J, Mühl H (1990). *Interleukin 1 and tumor necrosis factor potentiate angiotensin II- and calcium ionophore-stimulated prostaglandin E2 synthesis in rat renal mesangial cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **169**: 585-595.
244. Pham H, Chong B, Vincenti R, Slice LW (2008). *Ang II and EGF synergistically induce COX-2-Expression via CREB in intestinal epithelial cells*. *J. Cell. Physiol* **214**: 96-109.
245. Scheuren N, Jacobs M, Ertl G, Schorb W (2002). *Cyclooxygenase-2 in myocardium stimulation by angiotensin-II in cultured cardiac fibroblasts and role at acute myocardial infarction*. *J. Mol. Cell. Cardiol* **34**: 29-37.

246. Martin M, Neumann D, Hoff T, Resch K, DeWitt DL, Goppelt-Struebe M (1994). *Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells*. *Kidney Int* **45**:150-158
247. Rzymiewicz D, Leingang K, Baird N, Morrison AR (1994). *Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase gene expression in rat mesangial cells by interleukin-1 beta*. *Am J Physiol* **266**: 39-45.
248. Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR (1998). *Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells*. *J. Biol. Chem* **273**: 28670-28676.
249. Kawamori T, Osta W, Johnson KR, Pettus BJ, Bielawski J, Tanaka T, Wargovich MJ, Reddy BS, Hannun YA, Obeid LM, Zhou D (2006). *Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis*. *FASEB J* **20**: 386-388.
250. Pettus BJ, Bielawski J, Porcelli AM, Reames DL, Johnson KR, Morrow J, Chalfant CE, Obeid LM, Hannun YA (2003). *The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha*. *FASEB J* **17**: 1411-1421.
251. Pettus BJ, Kitatani K, Chalfant CE, Taha TA, Kawamori T, Bielawski J, Obeid LM, Hannun YA (2005). *The coordination of prostaglandin E2 production by sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate*. *Mol Pharmacol* **68**: 330-335.
252. Moon MH, Jeong JK, Lee YJ, Seol JW, Park SY (2012). *Sphingosine-1-phosphate inhibits interleukin-1 β -induced inflammation in human articular chondrocytes*. *Int. J. Mol. Med* **30**: 1451-1458.
253. Goetzl EJ, Rosen H (2004). *Regulation of immunity by lysosphingolipids and their G protein-coupled receptors*. *J Clin Invest* **114**: 1531-1537.
254. Olivera A, Rivera J (2005). *Sphingolipids and the balancing of immune cell function: lessons from the mast cell*. *J Immunol* **174**: 1153-1158.
255. Tani M, Okino N, Mitsutake S, Ito M (1999). *Specific and sensitive assay for alkaline and neutral ceramidases involving C12-NBD-ceramide*. *J Biochem* **125**: 746-9.
256. Mao C, Obeid LM (2008). *Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate*. *Biochim Biophys Acta* **1781**(9): 424-34.
257. Ferlinz K, Kopal G, Bernardo K, Linke T, Bar J, Breiden B, Neumann U, Lang F, Schuchman EH, Sandhoff K (2001). *Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting*. *J Biol Chem* **276**: 35352-60.
258. Van Brocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, Prior TW (2005). *Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with*

- glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines*. J Neuropathol Exp Neurol **64**: 695-705.
259. Li W, Yu CP, Xia JT, Zhang L, Weng GX, Zheng HQ, Kong QL, Hu LJ, Zeng MS, Zeng YX, Li M, Li J, Song LB (2009). *Sphingosine kinase 1 is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients*. Clin Cancer Res **15**: 1393-9.
260. Hofmann LP, Ren S, Schwalm S, Pfeilschifter J, Huwiler A (2008). *Sphingosine kinase 1 and 2 regulate the capacity of mesangial cells to resist apoptotic stimuli in an opposing manner*. Biol Chem **389**: 1399-1407.
261. Döll F, Pfeilschifter J, Huwiler A (2005). *The epidermal growth factor upregulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human mammary carcinoma cell line MCF7*. Biochim Biophys Acta **1738**: 72-81.
262. Döll F, Pfeilschifter J, Huwiler A (2007). *The mammogenic hormone prolactin chronically upregulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human breast cancer cell line MCF7 which contributes to enhanced proliferation and migration*. Endocrine-related Cancer **14**: 325-335.
263. Ruckhaberle E, Rody A, Engels K, Gaetje R, von Minckwitz G, Schiffmann S, Grösch S, Geisslinger G, Holtrich U, Karn T, Kaufmann M (2008). *Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. **112**: 41-52.
264. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, Garland WA, Lu Y, Yu S, Hall HS, Kundra V, Mills GB, Sabbadini RA (2006). *Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages*. Cancer Cell **9**: 225-38.
265. O'Brien N, Jones ST, Williams DG, Cunningham HB, Moreno K, Visentin B, Gentile A, Vekich J, Shestowsky W, Hiraiwa M, Matteo R, Cavalli A, Grotjahn D, Grant M, Hansen G, Campbell MA, Sabbadini R (2009). *Production and characterization of monoclonal anti-sphingosine-1-phosphate antibodies*. J Lipid Res **50**: 2245-57.
266. Wojciak JM, Zhu N, Schuerenberg KT, Moreno K, Shestowsky WS, Hiraiwa M, Sabbadini R, Huxford T (2009). *The crystal structure of sphingosine-1-phosphate in complex with a Fab fragment reveals metal bridging of an antibody and its antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A **106**: 17717-22.
267. Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP (1998). *Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **95**: 8806-8811.

268. Goke R, Goke A, Goke B, El Deiry WS, Chen Y (2001). *Pioglitazone inhibits growth of carcinoid cells and promotes TRAIL-induced apoptosis by induction of p21waf1/cip1*. *Digestion* **64**: 75-80.
269. Hashimoto Y, Shimada Y, Itami A, Ito T, Kawamura J, Kawabe A, Kaganoi J, Maeda M, Watanabe G, Imamura M (2003). Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* **39**: 2239-2246.
270. Heaney AP, Fernando M, Melmed S (2003). *PPAR-gamma receptor ligands: novel therapy for pituitary adenomas*. *J. Clin. Invest* **111**: 1381-1388.
271. Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T (2001). *Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice*. *J. Biol. Chem.* **276**: 18563-18569.
272. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM (1996). *Suppression of intestinal polyposis in APC knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2)*. *Cell* **87**: 803-09.
273. Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, Taketo MM, Evans JF (2001). *Chemoprevention of intestinal polyposis in Apc716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor*. *Cancer Res* **61**: 1733-40.
274. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS (1998). *Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis*. *Cancer Res* **58**: 409-12.
275. Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K (2000). *Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor*. *Cancer Res* **60**: 2101-03.
276. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN (1997). *Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2*. *J Clin Invest* **99**: 2254-59.
277. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K (2001). *Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer*. *The Lancet Oncology* **2**: 544-551.
278. Fujimura T, Ohta T, Oyama K, Miyashita T, Miwa K (2006): *Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancers: a review and report of personal experience*. *World J Gastroenterol* **12**: 1336-1345.
279. Hull MA (2005). *Cyclooxygenase-2: how good is it as a target for cancer chemoprevention?* *Eur J Cancer* **41**: 1854-1863
280. Whelton A, Schulman G, Wallemark C, Drower EJ, Isakson PC, Verburg KM, Geis GS (2000). *Effects of celecoxib and naproxen on renal function in the elderly*. *Arch Intern Med* **160**: 1465-1470.

-
281. Kömhoff M, Wang JL, Cheng HF, Langenbach R, McKanna JA, Harris RC, Breyer MD (2000). *Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development*. *Kidney Int* **57**: 414-22.
282. Schneider A, Harendza S, Zahner G, Jocks T, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA (1999). *Cyclooxygenase metabolites mediate glomerular monocyte chemoattractant protein-1 formation and monocyte recruitment in experimental glomerulonephritis*. *Kidney Int* **55**: 430-41.
283. Shehadeh IH, Demers LM, Abt AB, Schoolwerth AC (1979). *Indomethacin and the nephrotic syndrome*. *JAMA*. **241**: 1264-6.
284. Gupta RA, DuBois RN (2001). *Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2*. *Nature Rev Cancer* **1**: 11-21

7 Anhang

7.1 Verwendete Primer

Alle Primer sind in 5´- nach 3´-Richtung angegeben. Bei Primern für die Mutation einer Sequenz sind die mutierten Basen unterstrichen angegeben.

Tabelle 5: Verwendete Primer

Primer-Name	Sequenz 5´- 3´	Beschreibung
rSK-1_I for	GCAGGTACCAGCCTTGAATTCCTGGGTGC	Klonierung des SK-1 Promotors der Ratte
rSK-1_II for	GCAGGTACCGTTCTTGCTCCCTCCAACTC	
rSK-1_III for	GCAGGTACCGATCCCTTGGAGTCTGTGTG	
rSK-1 rev	CGCACTCGAGAGCTGCTTATCGGTGT	
rSK-1 ΔPPRE7 for	GGCCTCTGGTT <u>CCG</u> CACCCTGTCC	Mutagenese des putativen PPRE des SK-1 Promotors der Ratte
rSK-1 ΔPPRE7 rev	GGACAGGGTG <u>CGG</u> AACCAGAGGCC	
EMSA_rSK-1 for	GGCCTCTGGTTGGGCACCCTGTCC	WT Sonde EMSA des SK-1 Promotors der Ratte
EMSA_rSK-1 rev	GGACAGGGTGCCCAACCAGAGGCC	
EMSA_rSK-1 ΔPPRE7 for	GGCCTCTGGTT <u>CCG</u> CACCCTGTCC	Mutierte Sonde EMSA des SK-1 Promotors der Ratte
EMSA_rSK-1 ΔPPRE7 rev	GGACAGGGTG <u>CGG</u> AACCAGAGGCC	
rS1P ₁ for	GCGGTACCCCGGGAAAGCCAC	Klonierung des S1P ₁ Promotors der Ratte
rS1P ₁ rev	GCACTCGAGGTCAGCAAGCAATCCG	
rS1P ₁ ΔPPRE for	CGGCCACACCTCTGACC <u>AGT</u> CCCTCAGCACACC	Mutagenese des putativen PPRES des S1P ₁ Promotors der Ratte
rS1P ₁ ΔPPRE rev	GGTGTGCTGAGGG <u>ACT</u> GGTCAGAGGTGTGGGCCG	
EMSA_rS1P ₁ for	CGGCCACACCTCTGACCAGACCTCAGCACACC	WT Sonde EMSA des S1P ₁ Promotors der Ratte
EMSA_rS1P ₁ rev	GGTGTGCTGAGGGTCTGGTCAGAGGTGTGGGCCG	
EMSA_rS1P ₁ ΔPPRE for	CGGCCACACCTCTGACC <u>AGT</u> CCCTCAGCACACC	Mutierte Sonde EMSA des S1P ₁ Promotors der Ratte
EMSA_rS1P ₁ ΔPPRE rev	GGTGTGCTGAGGG <u>ACT</u> GGTCAGAGGTGTGGGCCG	

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Biosynthese von Sphingolipiden.	4
Abb. 2: Struktur der Sphingosinkinase-1 und -2 (SK-1 und -2).	6
Abb. 3: Signalwege von Sphingosin-1-Phosphat (S1P).	10
Abb. 4: Schematischer Aufbau und <i>Periodic Acid Schiff</i> (PAS)-Färbung eines Glomerulums.	12
Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen <i>peroxisome proliferator activated receptor</i> (PPAR) Domänen.....	18
Abb. 6: <i>Peroxisome proliferator activated receptor</i> γ (PPAR γ)-vermittelte Genexpression.	19
Abb. 7: Synthesewege der Eicosanoide. Modifiziert nach Gambaro [109].	22
Abb. 8: Schematische Darstellung der Prostaglandin- und Thromboxanbiosynthese.	24
Abb. 9: Struktur der bekannten Cyclooxygenase (COX) Varianten.....	27
Abb. 10: Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade der Cyclooxygenase (COX)- Expression.	30
Abb. 11: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die zelluläre Konzentration von Sphingosin- 1-Phosphat (S1P) in Mesangiumzellen der Ratte.	71
Abb. 12: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Sphingosinkinase-1 (SK-1)-Aktivität in Mesangiumzellen der Ratte.	72
Abb. 13: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in Mesangiumzellen der Ratte.....	73
Abb. 14: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Protein- und mRNA-Expression der Sphingosinkinase-1 und -2 (SK-1 und -2) in Mesangiumzellen der Ratte.	74
Abb. 15: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in humanen Mesangiumzellen.....	75
Abb. 16: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in Mesangiumzellen der Maus.	76
Abb. 17: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in Mäusen.	78
Abb. 18: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) und GW-9662 auf die mRNA-Expression und Aktivität der Sphingosinkinase-1 (SK-1) in Mesangiumzellen der Ratte.	79
Abb. 19: Schematische Übersicht der klonierten Promotorfragmente der Sphingosinkinase-1 (SK-1) mit dem deletierten <i>peroxisome proliferator response element 7</i> (PPRE 7) und die Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Promotoraktivität der SK-1 in <i>Normal Rat Kidney</i> (NRK) Zellen.....	81
Abb. 20: <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) für das <i>peroxisome proliferator response</i> <i>element 7</i> (PPRE 7) mit Kernextrakten aus Thiazolidindionen (TZDs)-stimulierten Mesangiumzellen der Ratte.	83
Abb. 21: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression von <i>connective tissue</i> <i>growth factor</i> (CTGF) in Mesangiumzellen.	84
Abb. 22: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs), <i>transforming growth factor-β</i> (TGF β) und dem Sphingosinkinase-1-Inhibitor (SKI II) auf die Proteinexpression von <i>connective tissue</i> <i>growth factor</i> (CTGF) in Mesangiumzellen der Ratte.	86
Abb. 23: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression von <i>connective tissue</i> <i>growth factor</i> (CTGF) in Wildtyp (WT)- und SK-1 ^{-/-} -Mesangiumzellen der Maus.....	87
Abb. 24: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die <i>connective tissue</i> <i>growth factor</i> (CTGF) Proteinexpression in Mäusen.....	88

Abb. 25: Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die Proteinexpression des S1P ₁ -Rezeptors in Mesangiumzellen der Ratte.	90
Abb. 26: Schematische Zeichnung des klonierten S1P ₁ -Rezeptor-Promotorfragments der Ratte (rS1P ₁) mit dem deletierten <i>peroxisome proliferator response element</i> (PPRE) und die Wirkung von Thiazolidindionen (TZDs) auf die S1P ₁ -Rezeptor-Promotoraktivität in <i>Normal Rat Kidney</i> (NRK)-Zellen.	91
Abb. 27: <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) für das <i>peroxisome proliferator response element</i> (PPRE) aus dem S1P ₁ -Rezeptor-Promotor der Ratte (rS1P ₁) mit Thiazolidindionen (TZDs) an Kernextrakten aus Mesangiumzellen der Ratte.....	92
Abb. 28: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die mRNA-Expression der Cyclooxygenase-1/2 (COX-1 und -2) in Mesangiumzellen der Ratte.....	94
Abb. 29: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.	95
Abb. 30: Wirkung von Actinomycin D (Act D) auf die mRNA-Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.....	96
Abb. 31: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptorantagonisten auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.	97
Abb. 32: Wirkung von siRNA gegen den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2 (S1P ₂) auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.	98
Abb. 33: Wirkung von Pertussistoxin (PTX) und Y 27632 auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.	100
Abb. 34: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die Phospho-p42/p44 Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-(MAPK) und der totalen p44-MAPK Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte.....	101
Abb. 35: Wirkung der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK)-Inhibitoren PD 98059, U0126 und SB 203580 auf die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.	102
Abb. 36: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die Angiotensin II (Ang II)-induzierte PGE ₂ -Synthese in Mesangiumzellen der Ratte.	103
Abb. 37: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Interleukin-1β (IL-1β) auf die Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Proteinexpression in Mesangiumzellen der Ratte.....	105
Abb. 38: Wirkung von Interleukin-1β (IL-1β) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die PGE ₂ -Synthese in Mesangiumzellen der Ratte.	106
Abb. 39: Zusammenfassendes Schema des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-2 (S1P ₂)-vermittelten Signalwegs der Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-induzierten Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Expression und PGE ₂ -Synthese in Mesangiumzellen der Ratte.	107
Abb. 40: Wirkung der Sphingosinkinaseinhibitoren 2-(p-Hydroxyanilino)-4-(p-Chlorophenyl)-thiazol (SKI II) und Dimethylsphingosin (DMS) auf die Proteinexpression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Mesangiumzellen der Ratte.	108
Abb. 41: Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Proteinexpression in Wildtyp (WT)- und SK-1 ^{-/-} -Mesangiumzellen der Maus.	109
Abb. 42: PGE ₂ -Synthese in Wildtyp (WT)- und SK-1 ^{-/-} -Mesangiumzellen der Maus.	109
Abb. 43: Zusammenfassendes Schema der Wirkung von <i>Peroxisome proliferator activated receptor</i> γ (PPARγ)-Agonisten auf die Expression und Aktivität der Sphingosinkinase-1 (SK-1), intrazellulärer Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Synthese und <i>connective tissue growth factor</i> (CTGF)-Expression in Mesangiumzellen. Modifiziert nach Koch <i>et al.</i> [196].	119

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prostaglandine und ihre physiologischen Effekte. Nach [125].	25
Tabelle 2: Zusammensetzung TBE-Gel	58
Tabelle 3: Pipettierschema für die Real-Time-PCR	61
Tabelle 4: Zusammensetzung der SDS-Gele.....	67
Tabelle 5: Verwendete Primer.....	158

7.4 Veröffentlichungen

7.4.1 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Koch A*, **Völzke A***, Wünsche C, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2012). *Thiazolidinedione-dependent activation of sphingosine kinase 1 causes an anti-fibrotic effect in renal mesangial cells*. Br J Pharmacol **166**: 1018-32.

*geteilte Autorenschaft

Koch A, **Völzke A**, Puff B, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2013). *PPAR γ agonists up-regulate sphingosine-1-phosphate (SIP) receptor 1 expression, which in turn represses SIP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in renal mesangial cells*. Biochim Biophys Acta (Manuskript).

Völzke A*, Koch A*, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2013). *Sphingosine 1-phosphate (SIP) induces COX-2-Expression and PGE2 formation via SIP receptor 2 in renal mesangial cells*. Biochim Biophys Acta (Manuskript).

*geteilte Autorenschaft

7.4.2 Sonstige Veröffentlichungen

Hänssler E, Müller T, Jessberger N, **Völzke A**, Plassmeier J, Kalinowski J, Krämer R, Burkovski A (2007). *FarR, a putative regulator of amino acid metabolism in Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol **76**: 625-32.

7.4.3 Kongressbeiträge

KOCH A, Völzke A, Pfeilschifter J, Huwiler A (2009). *PPAR γ agonists up-regulate sphingosine 1-phosphate receptor 1 (SIP₁) expression and reduce [Ca²⁺]_i in rat mesangial cells*. **XVI Lipid Meeting**; Leipzig, Germany.

Völzke A (2010). *The role of PPAR γ -ligands on sphingosine kinases and SIP levels in rat mesangial cells*. **LIFF-Nachwuchskolleg-Seminar**, Frankfurt am Main, Germany

Völzke A, KOCH A, Huwiler A, Pfeilschifter J (2010). *Sphingosine kinase-1 contributes to the anti-fibrotic effect of PPAR γ agonists*. **8th International Sphingolipid Club Meeting**; Glasgow, United Kingdom.

KOCH A, Völzke A, Wünsche C, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2011). *Thiazolidinedione-dependent sphingosine kinase-1 activation in renal mesangial cells: A novel functional aspect to explain the anti-fibrotic capacity of PPAR γ* . **23rd Annual Meeting of the European Renal Cell Study Group**; Desenzano del Garda, Italy.

Völzke A, KOCH A, Wünsche C, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2011). *Thiazolidinedione-dependent activation of sphingosine kinase-1 contributes to the anti-fibrotic effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in mesangial cells*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 383**: 16-17.

Wünsche C, KOCH A, Ungerer C, Völzke A, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2011). *Effect of transforming growth factor-beta (TGF β) on SIP receptor expression in human glomerular cells*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 383**: 22.

KOCH A, Völzke A, Wünsche C, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2011). *Thiazolidinedione dependent activation of sphingosine kinase 1 contributes to the anti-fibrotic effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. **XVII Lipid Meeting**; Leipzig, Germany.

KOCH A, Völzke A, Wünsche C, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2012). *Thiazolidinedione-dependent activation of sphingosine kinase 1 causes an anti-fibrotic effect in renal mesangial cells*. **Lipid Signaling Symposium der FOG 784**; Frankfurt am Main, Germany.

KOCH A, Völzke A, Wünsche C, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2012). *Activation of sphingosine kinase 1 by PPAR γ agonists causes an anti-fibrotic effect in renal mesangial cells*. **EMBO Workshop on Molecular Medicine of Sphingolipids**; Ramot, Sea of Galilee, Israel.

KOCH A, Völzke A, Wünsche C, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2013). *Activation of sphingosine kinase 1 by PPARgamma agonists causes an anti-fibrotic effect in renal mesangial cells*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** **386**: 42.

KOCH A, Völzke A, Meyer zu Heringdorf D, Huwiler A, Pfeilschifter J (2013). *Sphingosine 1-phosphate (S1P) induces COX-2 expression and PGE₂ formation via S1P receptor 2 in renal mesangial cells*. **25th Annual Meeting of the European Renal Cell Study Group**; Oxfordshire, United Kingdom.

Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 25. April 2013

Anja Völzke

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

- Name: Anja Völzke
- Geburtsdatum und Geburtsort: 26.08.1983 in Zittau
- Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

- 09/2009 - heute **KLINIKUM DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN**
- **Dissertation** am Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Josef Pfeilschifter); Thema: *„Die Bedeutung des Sphingolipidstoffwechsels für die Generierung von inflammatorischen und fibrotischen Mediatoren in renalen Mesangiumzellen.“*
- 10/2003 – 02/2008 **FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT ERLANGEN**
- **Studium** der Biologie (Dipl.)
 - **Diplomarbeit** am Institut für Mikrobiologie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andreas Burkowski)
- 1994 - 2003 **GYMNASIUM STEIN BEI NÜRNBERG**
- Abitur

AUSLANDSAUFENTHALTE

- 08/2000 – 08/2001 **ECOLE SECONDAIRE LA CONCORDE**
- Auslandsaufenthalt in Québec, Canada
Besuch der Schule „*Ecole secondaire La Concorde*“

PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN

- 05/2008 – 07/2009 **KLINIK FÜR NEUROCHIRURGIE, ERLANGEN**
- Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Erlangen, Schwerpunkt Neuroendokrinologie