

Die Rolle der Sphingosinkinase 2 bei fibrotischen Nierenerkrankungen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Sandra Beyer
aus Bad Homburg v.d. Höhe

Frankfurt am Main, 2018

D 30

vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Jochen Klein
Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

Datum der Disputation: 06.12.2018

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Funktion der Niere.....	1
1.1.1.	Nierenanatomie und -physiologie	1
1.1.2.	Physiologie und Pathophysiologie des Mesangiums	3
1.1.3.	Apoptose in Mesangiumzellen.....	5
1.2.	Pathophysiologie der Niere - Unilaterale Ureterobstruktion als	8
	Modell für tubuläre Fibrose.....	8
1.3.	Die Rolle des TGF β -Signalwegs in der Nierenfibrose.....	10
1.4.	Sphingolipide.....	11
1.4.1.	Struktur und Stoffwechsel.....	12
1.4.2.	Sphingosinkinasen	15
1.5.	Zielsetzung der Arbeit	18
2.	Material und Methoden.....	19
2.1.	Materialien	19
2.1.1.	Chemikalien	19
2.1.2.	Zellkulturreagenzien und -stimulanzen	20
2.1.3.	Verwendete Medikamente für die Maus-Versuche	21
2.1.4.	Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	22
2.1.5.	Antikörper.....	23
2.1.6.	siRNA-Oligonukleotide	25
2.1.7.	Taqman $^{\circledR}$ -Sonden.....	25
2.1.8.	Enzyme, Reagenzien	26
2.1.9.	Puffer- und Lösungszusammensetzungen	27
2.1.10.	Operationsbesteck.....	31
2.1.11.	Geräte	31
2.1.12.	Verwendete Tiere	32
2.1.13.	Verwendete Zellen.....	34
2.2.	Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.1.	Isolation von Maus-Glomerula für Maus-Mesangiumzellen.....	34
2.2.2.	Kultivierung von Zellen	35
2.2.3.	Subkultivierung von adhären wachsenden Zellen.....	35
2.2.4.	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	35
2.2.5.	Stimulation adhären wachsender Zellen.....	35
2.2.6.	Zellzählung.....	36
2.2.7.	Transiente Transfektion von HK2 Zellen.....	36
2.3.	Durchführung der unilateralen Ureterobstruktion an der Maus	36

2.4.	Molekularbiologische Methoden	37
2.4.1.	RNA-Isolation	37
2.4.2.	Konzentration- und Reinheitsbestimmung der RNA	38
2.4.3.	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
2.4.4.	Real-Time-PCR (Taqman®)	38
2.5.	Proteinbiochemische Methoden	39
2.5.1.	Präparation von Zelllysaten	39
2.5.2.	Bestimmung des Proteingehaltes	40
2.5.3.	Trichloressigsäure-Präzipitation von Proteinen aus	40
	Zellkulturüberständen	40
2.5.4.	Kernprotein-Extraktion	40
2.5.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.5.6.	Western Blot Analyse	42
2.6.	Bestimmung zellulärer Parameter	43
2.6.1.	Aktivitätsmessung der Sphingosinkinase	43
2.6.2.	Nachweis der Proliferation mittels [³ H]-Thymidin-Einbau	44
2.6.3.	DNA-Fragmentierungs-ELISA	44
2.7.	Lipid-Analyse mittels LC-MS/MS	45
2.8.	Histologische Immunochemie	46
2.8.1.	Vorbereitung der Paraffinblöcke	46
2.8.2.	SK2 Färbung	46
2.8.3.	Sirius Red Färbung	47
2.8.4.	AZAN-Färbung	48
2.8.5.	PAS-Reaktion	49
2.8.6.	α-SMA-Färbung	49
2.8.7.	Makrophagen-Infiltration	50
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Unilaterale Ureterobstruktion als Modell für eine tubulointerstitielle Fibrose	52
3.1.1.	Wildtyp- und SK2 ^{-/-} -Mäuse	52
3.1.2.	SK2-Defizienz in Fibroblasten und tubulären Zellen	61
3.1.3.	hSK2 Kontrollen und hSK2 überexprimierende Mäuse	64
3.2.	Maus-Mesangiumzellen	70
3.2.1.	Charakterisierung der Maus-Mesangiumzellen hinsichtlich der	70
	Sphingosinkinase 2	70
3.2.2.	Sphingolipidzusammensetzung in den Maus-Mesangiumzellen	72
3.2.3.	Expression der S1P-Rezeptoren	73
3.2.4.	Nachweis der Proliferation	74
3.2.5.	ERK und Akt Phosphorylierung	75

3.2.6. Apoptose in Maus-Mesangiumzellen	75
4. Diskussion.....	79
5. Ausblick.....	86
6. Zusammenfassung.....	87
7. Summary.....	89
8. Anhang.....	91
8.1. Abkürzungsverzeichnis	91
8.2. Tabellenverzeichnis.....	93
8.3. Abbildungsverzeichnis.....	93
8.4. Literaturverzeichnis	95

1. Einleitung

1.1. Funktion der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes, retroperitoneal gelegenes Organ, das zentrale Steuerfunktionen des Körpers übernimmt. Sie filtert wasserlösliche Endprodukte des Eiweißstoffwechsels wie Harnstoff, Kreatinin und Harnsäure, sowie auch Fremdstoffe zum Beispiel Medikamente und Gifte aus dem Körper und scheidet diese aus. Außerdem hat die Niere wichtige regulatorische Funktionen beim Wasserhaushalt, Mineralhaushalt, Säure-Base-Haushalt, Blutdruck und Blutvolumen (Behrends 2012; Hick und Hick 2009). Die Niere ist allerdings nicht nur ein Ausscheidorgan, sondern übernimmt auch metabolische Aufgaben wie Glukoneogenese und Proteinabbau. Des Weiteren spielt sie als endokrines Organ eine wichtige Rolle für die Blutbildung, da Erythropoietin in der Nierenrinde synthetisiert wird, sowie für den Knochenstoffwechsel durch die Bildung von Kalzitriol (Behrends 2012).

1.1.1. Nierenanatomie und -physiologie

Die Niere (Abb. 1) wird von einer etwa 1 cm breiten Rinde umgeben, die das kegelförmige Nierenmark umschließt (Behrends 2012). Das Nephron ist die Funktionseinheit der Niere und besteht aus dem Glomerulum, das von der Bowman-Kapsel umschlossen ist, und einem Tubulussystem. Die Glomerula liegen dabei in der Nierenrinde, wobei das Tubulussystem das Nierenmark durchzieht (Hick und Hick 2009).

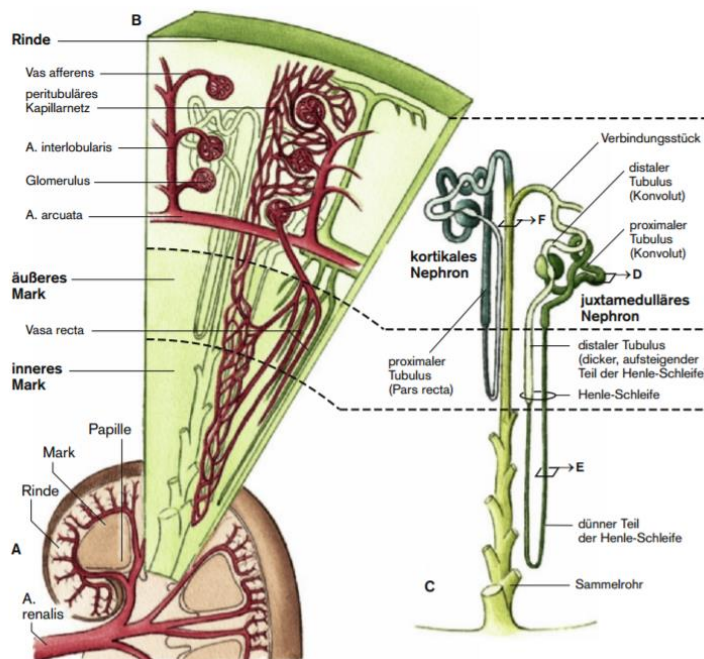


Abb. 1: Anatomie der Niere

In der Nierenrinde sind etwa 1 Millionen Glomerula enthalten, die jeweils in einen Tubulus münden. Zusammen werden sie als Nephron bezeichnet. Die Henle-Schleife eines juxtamedullären Nephrons reicht bis ins innere Nierenmark. Der distale Tubulus endet über ein Verbindungsstück im Sammelrohr (Klinke und Silbernagl 2010).

Das Tubulussystem wird dabei in drei Abschnitte unterteilt, den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife und den distalen Tubulus. Durch das eingestülpte Tubulussystem, welches das Glomerulum umhüllt, entsteht die Bowman-Kapsel (Behrends 2012). Die zuführende Arterie *vas afferens* verzweigt sich in der Bowman-Kapsel in etwa 30 Kapillarschlingen und bildet so das Glomerulum. Das Glomerulum und die Bowman-Kapsel zusammen werden als Nierenkörperchen bezeichnet (Abb. 2).

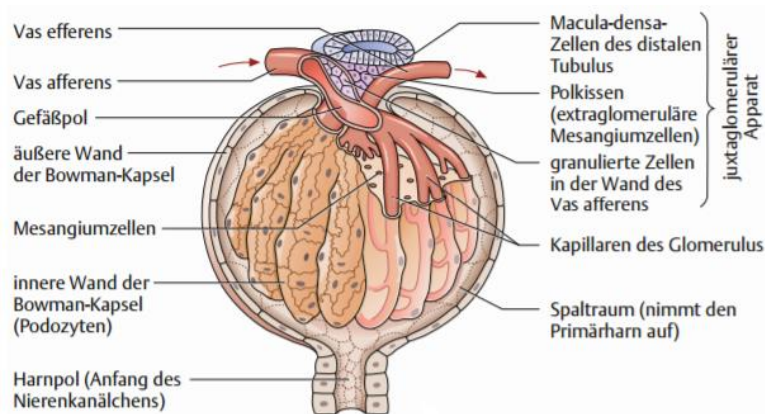


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Nierenkörperchens

Ein Nierenkörperchen besteht aus dem Glomerulum und der Bowman-Kapsel. Durch das Kapillarendothel, die Basalmembran und die Schlitzdiaphragmen zwischen den Podozyten-Fussfortsätzen entsteht ein Filtersystem. Der dabei entstehende Primärharn wird im Spaltraum aufgenommen (Behrends 2012).

Das Kapillarendothel der Glomerulumsschlingen ist fenestriert, so dass der Blutraum nur durch eine Basalmembran und die Schlitzdiaphragmen zwischen den Podozyten-Fortsätzen vom Harnsystem getrennt ist. Dadurch entsteht ein Molekularsieb, welches Moleküle bis zu einer Größe von 70.000 Dalton passieren lässt. Beim Durchtrittsvermögen spielt die Form und die elektrische Ladung eine wichtige Rolle. So erleichtern ein kugelförmiger Aufbau und positive Ladung den Durchtritt durch die Basalmembran (Lüllmann et al. 2010).

Das Filtratvolumen aller Glomerula beider Nieren pro Zeiteinheit definiert die glomeruläre Filtrationsrate. Durch die Filtration des Plasmas werden täglich etwa 180 L Primärharn in den Glomerula gebildet. Die Zusammensetzung des Primärharns wird durch Sekretion und Rückresorption im Tubulussystem verändert. Mit Hilfe spezifischer Transportsysteme, dem Gegenstromprinzip des harnleitenden Systems, sowie den versorgenden Blutgefäßen, wird ein osmotischer Konzentrationsgradient aufgebaut. Durch dieses System kann eine Anpassung der im Urin vorhandenen Stoffe zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Körpers erfolgen (Behrends 2012).

1.1.2. Physiologie und Pathophysiologie des Mesangiums

Das Mesangium bildet die zentrale Region des renalen Glomerulums und schützt dieses. Es besteht aus Mesangiumzellen und deren Extrazellulärmatrix. Diese Extrazellulärmatrix wird von den Mesangiumzellen produziert und enthält unter anderem Kollagen, Laminin, Fibronectin und Proteoglykane (Scindia et al. 2010; Schlöndorff und Banas 2009).

Mesangiumzellen lassen sich in zwei verschiedene Typen unterscheiden. Zu 90% besitzen die Mesangiumzellen *smooth muscle actin* und Myosin, wobei deren Kontraktion das Kapillarlumen verengen kann. Dies führt zu vermehrtem Blutfluss in den glomerulären Spalt und beeinflusst die glomeruläre Filtration. Die restlichen Mesangiumzellen stammen aus dem Knochenmark und sind MHC (*major histocompatibility complex*) II positive, Makrophagen-Monozyten-ähnliche, phagozytierende Zellen (Scindia et al. 2010).

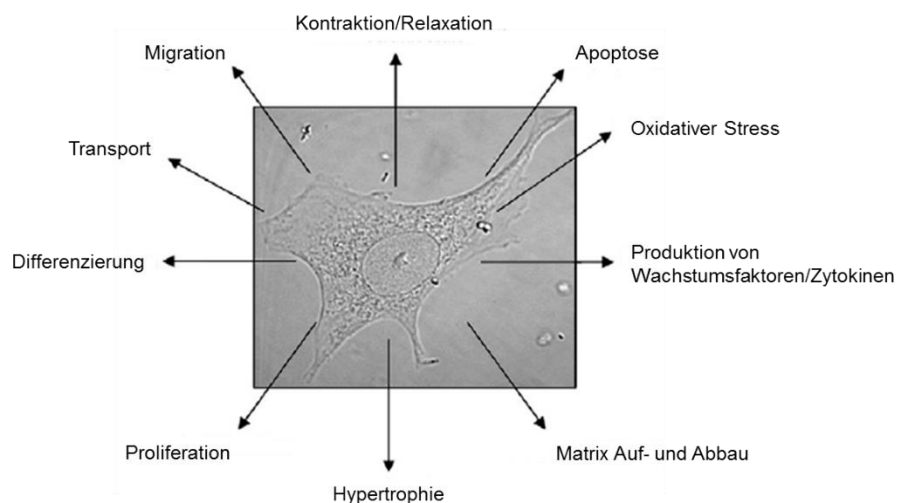


Abb. 3: Biologische Antworten der Mesangiumzellen auf Entzündung

Die Mesangiumzelle kann mit verschiedenen Zellantworten auf eine Entzündung reagieren. Apoptose, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, Auf- und Abbau von Matrix, Hypertrophie, Proliferation, Differenzierung, Transport, Migration und Kontraktion, bzw. Relaxation sind die hauptsächlichen Funktionen und Antworten der Mesangiumzellen und tragen zu verschiedenen glomerulären Erkrankungen bei. Abb. modifiziert von (Abboud 2012).

Mesangiumzellen haben verschiedene Zellantworten (Abb. 3). Dazu zählen unter anderem Apoptose, Proliferation, Migration, Matrixproduktion, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Dabei sind Proliferation und exzessiver Matrixaufbau häufige Merkmale glomerulärer Erkrankungen. Außerdem kommt es in Folge von Entzündungen zu vermehrter Proliferation, welche zu einem glomerulären Umbau führt. Um einer Mesangiolyse (Verlust von Mesangiumzellen) entgegen zu wirken und die glomeruläre Struktur zu erhalten, proliferieren, migrieren und gegebenenfalls differenzieren Mesangiumzellen. Apoptose dagegen limitiert die glomeruläre Hyperzellularität (vermehrter Zellgehalt). Die Lyse, sowie Proliferation, Migration und Matrixaufbau gehören zu dem regenerativen Prozess der normalen Wundheilung (Abboud 2012).

Dagegen kann die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren durch die Mesangiumzellen in einem Teufelskreis enden, da diese Mediatoren die Endothelbarriere verändern. Weitere Makromoleküle gelangen in das Mesangium und die Produktion der Entzündungsmediatoren wird weiter verstärkt. Die Pathologie der Mesangiumzellen spielt infolgedessen eine Rolle in der Entstehung verschiedener glomerulärer Erkrankungen, wie IgA Nephropathie, mesangioproliferative Glomerulonephritis und Lupus Nephritis. Die IgA Nephropathie ist eine Form der mesangioproliferativen Glomerulonephritis und ist charakterisiert durch mesangiale Immunglobulin A Ablagerung, Proliferation der Mesangiumzellen und Matrixexpansion ohne direkte Mitwirkung von inflammatorischen Zellen. Die Patienten bilden dabei Immunglobulin A-Antikörper, die zu einer Aktivierung der Mesangiumzellen mit Proliferation und Matrixaufbau führen.

Die diabetische Nephropathie dagegen wird durch einen erhöhten Glukosespiegel ausgelöst und betrifft alle Nierenzellen. Hierbei entsteht eine glomeruläre Hypertension, welche zu Zellhypertrophie, Proliferation und Matrixaufbau führt. Die Produktion von Chemokinen durch die Mesangiumzellen führt zu einem inflammatorischen Einwandern von Leukozyten, was zu einer destruktiven pro-apoptotischen und pro-fibrotischen Antwort führt (Schlöndorff und Banas 2009). Durch die Hyperglykämie wird die Expression von TGF (*transforming growth factor*)- β (siehe 1.3) sowohl im Tiermodell (Park et al. 1997) als auch in kultivierten Mesangiumzellen erhöht (Wahab et al. 1996). TGF β spielt dabei eine Schlüsselrolle bei der Produktion von Proteinen der Extrazellulärmatrix in Mesangiumzellen (Wahab et al. 1996). Dies zeigt sich beispielsweise durch die Erhöhung der *messenger* RNA (mRNA) Spiegel von Collagen IV und Fibronectin als Bestandteile der Extrazellulärmatrix (Hänsch et al. 1995). Der Aufbau und die Menge der Extrazellulärmatrix wird unter physiologischen Bedingungen sehr genau kontrolliert. Allerdings spielt ebenso der Abbau eine große Rolle in der Entstehung renaler Erkrankungen (Kurihara und Sakai 2017). Der Abbau der Extrazellulärmatrix unterliegt den Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und der Plasmin Kaskade (Baricos et al. 1995). MMPs bilden eine große Familie von Peptidasen, die Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen und membrantypische MMPs beinhalten. Dabei regulieren *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs) die MMP Aktivität negativ, wodurch eine Akkumulation der Extrazellulärmatrix entstehen kann (Visse und Nagase 2003).

1.1.3. Apoptose in Mesangiumzellen

Das Wort „Apoptose“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet Wegfall. In der Biologie steht es für den programmierten Zelltod. Die Apoptose spielt nicht nur eine wichtige Rolle während der Entwicklung, sondern auch im adulten Leben. In adulten Organismen sorgt Apoptose für die Balance zwischen Zellteilung und Zellabbau, wodurch sie auf diese Weise die Konstanz von Geweben erhält. Des Weiteren werden Zellen mit genetischem Defekt, alte oder kranke Zellen, sowie Zellen, die mit schädlichen Substanzen in Berührung gekommen sind, entsorgt. Wie in Abb. 4 dargestellt, ist Apoptose charakterisiert durch Kernschrumpfung, Kondensation des Chromatins im Zellkern, Fragmentierung des Zellkerns und der DNA, und Ausstülpung von Zellmembranblasen durch Zerstörung des Zytoskeletts, wobei die Integrität der Plasmamembran erhalten bleibt. Die ausgestülpten Membranteile werden abgeschnürt und es entstehen apoptotische Körperchen. Diese apoptotischen Körperchen, sowie apoptotische Zellen werden durch Phagozytose abgebaut, so dass keine Entzündungsreaktion oder Gewebeschädigung entsteht (Saikumar et al. 1999; Ganten et al. 2008).

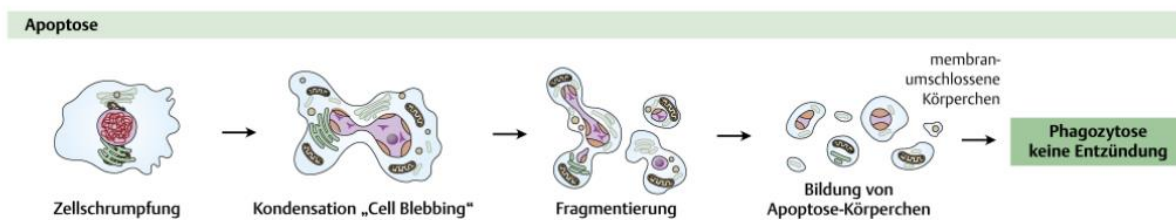


Abb. 4: Merkmale der Apoptose

Zunächst schrumpfen die Zelle und der Zellkern. Es findet eine Chromatinkondensation statt, sowie eine DNA- und Zellfragmentierung. Makrophagen erkennen die Apoptose-Körperchen und phagozytieren diese um eine Entzündung zu verhindern (Püschel 2011).

Die Apoptose wird durch bestimmte Signale und Signalwege reguliert. Hierbei können zwei unterschiedliche Apoptosesignalwege unterschieden werden, der extrinsische und der intrinsische Signalweg (Abb. 5). Der entscheidende Schritt beider Wege ist die Aktivierung der sogenannten Initiatorcaspasen. Diese erfolgt bei beiden Wegen in einem Signalkomplex, wodurch eine Kompartimentierung von Zelltodsignalen an ausgewählten Orten einer Zelle erreicht wird.

Caspasen werden als inaktive Vorstufen des Enzyms synthetisiert und deswegen auch als Procaspasen (Zymogen) bezeichnet. Ihr aktives Zentrum trägt ein Cystein und da sie vor einem Aspartat im Zielprotein spalten, lässt sich hieraus der Name Cysteinylaspartase, kurz Caspase, ableiten. Die Caspasen-2, -9 und -8, -10 und werden als Initiatorcaspasen bezeichnet, da sie die Endstrecke der Apoptose einleiten. Die Caspasen-2 und -9 besitzen eine Caspase-Rekrutierungsdomäne während die Caspasen-8 und -10 eine Todeseffektordomäne besitzen. Hierdurch sind die Initiatorcaspasen in der Lage mit Adaptermolekülen wie FADD (*fas associated death domain*) und APAF-1 (*apoptotic-protease-*

activating factor-1) zu interagieren. Im extrinsischen Signalweg erfolgt dies im DISC (*death inducing signaling complex*). Dieser Komplex besteht aus dem Todesligand, dem Todesrezeptor, dem Adapter FADD und der Initiatorcaspase-8 oder -10. Durch FLIP (*FLICE-associated huge protein*)-Proteine kann die Komplexbildung gehemmt werden. Der intrinsische Weg wird über die Bcl-2 Genfamilie reguliert. BH3-*only*-Proteine inaktivieren anti-apoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL oder binden direkt an Bax und/oder Bak. Dadurch werden Bax und Bak aktiviert und permeabilisieren die äußere Mitochondrienmembran. In der Folge werden der APAF-1, Cytochrom c und Smac freigesetzt. APAF-1 und Cytochrom c bilden über einen energieabhängigen Mechanismus das Apoptosom. Die Initiatorcaspase-9 wird im Apoptosom gebunden und aktiviert (Saikumar et al. 1999; Riedl und Shi 2004; Ganten et al. 2008).

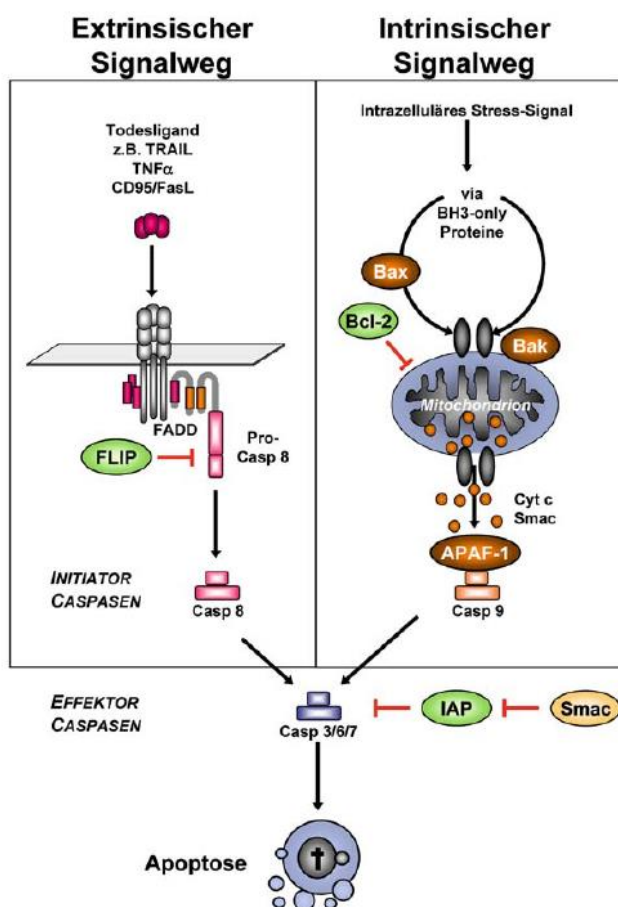


Abb. 5: Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg

Im extrinsischen Signalweg bindet der Todesligand an den Todesrezeptor. Zusammen mit dem Adapter FADD und den Initiatorcaspasen-8 oder -10 wird der DISC (*death inducing signaling complex*) gebildet. Durch den Komplex werden die Initiatorcaspasen aktiviert. Im intrinsischen Signalweg werden Bak und Bax durch BH3-*only*-Proteine aktiviert und inaktivieren Bcl-2 als anti-apoptotisches Protein. Bak und Bax permeabilisieren außerdem die äußere Mitochondrienmembran, so dass APAF-1 und Cytochrom c freigesetzt werden und das Apoptosom bilden können. Im Apoptosom wird die Caspase-9 gebunden und aktiviert. Beide Signalwege aktivieren anschließend die Effektorcaspasen, die den unumkehrbaren Zelltod einleiten (Ganten et al. 2008).

Die aktiven Initiatorcaspasen können durch Proteolyse die Effektorcaspasen-3, -6, -7 aktivieren. Die Effektorcaspasen können dabei durch die IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Proteinfamilie gehemmt werden. Die aktiven Effektorcaspasen leiten daraufhin den unumkehrbaren Zelltod ein. Dazu spalten sie eine Vielzahl von regulatorischen und strukturellen Proteinen. Dies führt letztendlich zum Anhalten des Zellzyklus, zur Inaktivierung der Reparaturmechanismen (z.B. DNA), zum Zerlegen molekularer Strukturen (Zytoskelett, Zellmembran), zur Zerstörung des Kontakts zur Extrazellulärmatrix und zu benachbarten Zellen, sowie zur Markierung für die Phagozytose (Riedl und Shi 2004). Ein wichtiges durch Caspase-3 gespaltenes, regulatorisches Protein ist das ATP-verbrauchende DNA-Reparatursystem Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP). PARP ist involviert in die DNA-Reparatur, die DNA-Stabilisierung und die transkriptionelle Regulation. Da Apoptose ein aktiver, energieabhängiger Mechanismus ist, hemmt die Caspase-3 PARP. Durch die Spaltung von PARP wird dessen ATP-Verbrauch für die Reparatursysteme gehemmt. Findet dieser Schritt nicht statt, so verschiebt sich der Zelltod in Richtung Nekrose, da diese energieunabhängig ist (Los et al. 2002). Wie am Anfang erwähnt, werden beschädigte Zellen durch Apoptose beseitigt. Aus diesem Grund nimmt Apoptose eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen ein, wie beispielsweise malignen Tumoren, Lupus Erythematosus und Alzheimer (Saikumar et al. 1999). Apoptose wurde des Weiteren in einigen Nierenerkrankungen beobachtet, z. B. in diabetischer Nephropathie. In Patientenproben konnte gezeigt werden, dass durch diabetische Nephropathie die Apoptoserate in den Glomerula und den Tubuli stark ansteigt und durch den Zellverlust, speziell der Podozyten, eine Proteinurie entsteht (Verzola et al. 2007). Weitere Untersuchungen in Mesangiumzellen zeigen, dass die unter 1.4 beschriebenen Sphingolipide ebenfalls einen Einfluss auf die Apoptoserate nehmen können. Entscheidend dabei sind die Sphingosin-1-Phosphat (S1P) produzierenden Sphingosinkinasen 1 und 2 (SK1 und SK2). Hofmann et al. konnten zeigen, dass die Expression dieser beiden Kinasen die Apoptoserate in Maus-Mesangiumzellen beeinflussen kann. So wurde beobachtet, dass eine SK1-Defizienz zu einer erhöhten Apoptoserate führt, wohingegen die Deletion der SK2 die Maus-Mesangiumzellen vor Apoptose zu schützen scheint (Hofmann et al. 2008).

1.2. Pathophysiologie der Niere - Unilaterale Ureterobstruktion als

Modell für tubuläre Fibrose

Die Ureterobstruktion ist ein häufiger Grund für eine Fehlfunktion der Niere durch eine Blockade des Urinflusses. Eine unbehandelte Obstruktion kann zu tubulointerstitieller Fibrose führen (Ucero et al. 2014). Tubulointerstitielle Fibrose ist ein finales Ergebnis von Nierenerkrankungen, das zum Nierenversagen führt. Typische Merkmale dafür sind der Aufbau von interstitieller Matrix initiiert durch inflammatorische Zellen, tubuläre Zelllyse, die Akkumulation von Fibroblasten und der Schwund von peritubulärer Mikrovaskulatur (Zeisberg und Neilson 2010). Als Modell für eine tubuläre Fibrose ist die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) in der Maus eine etablierte Methode. Dazu wird meist der linke Ureter abgeklemmt (Abb. 6), so dass eine tubulointerstitielle Fibrose entsteht. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass keine exogenen Toxine verabreicht werden müssen, keine Urämie verursacht wird und die Möglichkeit besteht, die kontralaterale Niere als Kontrolle zu verwenden (Chevalier et al. 2009).

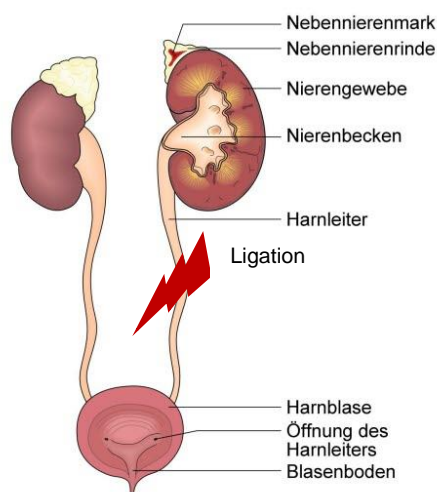


Abb. 6: Schema der unilateralen Ureterobstruktion

Bei der unilateralen Ureterobstruktion wird ein Harnleiter, meistens der linke, abgeklemmt oder abgebunden, so dass eine tubulointerstitielle Fibrose entsteht. Modifiziert nach (<https://deximed.de/home/b/niere-harnwege/patienteninformationen/andere-harnwegserkrankungen/krebserkrankungen-der-oberen-harnwege/>).

UUO führt innerhalb von 24 Stunden zu verringertem renalen Blutfluss und zu einer verringerten glomerulären Filtrationsrate. Dies hat eine Hydronephrose, Entzündungen durch Makrophageninfiltration, sowie Apoptose und Nekrose der tubulären Zellen zur Folge. Dabei infiltrieren die Makrophagen das Gewebe und produzieren Zytokine. Diese Zytokine führen zu tubulärer Apoptose und Fibroblastenproliferation und -aktivierung. Durch den tubulären Zelltod formen sich atubuläre Glomerula und eine tubuläre Atrophie entsteht. Chronisches UUO

aktiviert das Renin-Angiotensin-System und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und NF κ -B, wodurch Makrophageninfiltration, tubuläre Apoptose und interstitielle Fibrose gefördert werden (Chevalier et al. 2009; Truong et al. 2011). Interstitielle Fibrose entsteht durch tubuläre Beschädigung und einer daraus resultierenden interstitiellen Entzündung. Residente Fibroblasten werden aktiviert, aber es werden ebenfalls von Stammzellen abgeleitete Fibroblasten (Fibrozyten) rekrutiert. Des Weiteren findet eine epitheliale zu mesenchymale Transformation (EMT) statt. Diese Myofibroblasten exprimieren nun α -smooth muscle actin (α -SMA) und erhöhen die Syntheserate der extrazellulären Matrixproteine (Truong et al. 2011). Allerdings ist die Theorie der Rekrutierung Stammzell-abgeleiteter Fibroblasten, sowie EMT noch nicht konsentiert. So gibt es ebenfalls Studien, die hauptsächlich eine Aktivierung residenter Fibroblasten beobachten konnten. Fibroblasten vernetzten sich untereinander und mit der Basalmembran des Tubulus, sowie den peritubulären Kapillaren und bilden auf diese Weise ein Netzwerk im Interstitium. Nach Aktivierung durch profibrotische Zytokine, bilden die Myofibroblasten, wie bereits beschrieben, α -SMA, aber auch eine erhöhte Menge an Matrixproteinen und Kollagenen. Durch diese erhöhte Produktion werden die Maschen des Netzwerkes geschlossen und vernarben durch Kontraktion. Die Vernarbung hat einen Funktionsverlust zur Folge (Kaissling et al. 2013). Ein wichtiges pro-fibrotisches Zytokin neben TNF (*tumor necrosis factor*)- α und PDGF (*platelet-derived growth factor*) bildet TGF β (siehe 1.3). Durch den Anstieg von TGF β werden viele zelluläre und molekulare Veränderungen in der Pathogenese der tubulointerstitiellen Fibrose ausgelöst, wie beispielsweise die Aktivierung von Fibroblasten, was zum Aufbau der Extrazellulärmatrix führt (Ucero et al. 2014; Klahr und Morrissey 2002). Kaneto et al. konnten zeigen, dass die mRNA Level von TGF β in humanen Patientenproben, bei denen der Ureter durch Tumore obstruiert ist, erhöht war. Dies war positiv korreliert zum interstitiellen Volumen, sowie zum erhöhten mRNA Spiegel von Kollagen IV und Fibronectin (Kaneto et al. 1999). Dies bestätigte Isaka et al., da eine Behandlung mit einem Antisense-Oligonukleotid gegen TGF β bei einer UUO in Ratten die Makrophageninfiltration und die Kollagen I Produktion vermindert (Isaka et al. 2000).

1.3. Die Rolle des TGF β -Signalwegs in der Nierenfibrose

TGF β ist ein Zytokin, das die Produktion der Extrazellulärmatrix reguliert und dadurch an der Wundheilung, Immunfunktionen, Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt ist (Kurihara und Sakai 2017). Es gibt drei Isoformen von TGF β , TGF β 1, 2 und 3. TGF β 1 ist die am häufigsten vorkommende Isoform und wird in einer latenten Form sezerniert, gebunden an das *latency-associated peptide* (LAP). Dieser Komplex bindet am Zielort an das *latent TGF β -binding protein* (LTBP). Es wird durch verschiedene Stimuli, wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies, Plasmin und Säuren aktiviert, wodurch LAP und LTBP abgespalten werden (Meng et al. 2015; Yan et al. 2009). Bis zur Aktivierung befindet sich TGF β 1 in der Extrazellulärmatrix (Kurihara und Sakai 2017). Das aktivierte TGF β bindet an den Typ II TGF β -Rezeptor, der eine konstitutiv aktive Kinase ist, den Typ I TGF β -Rezeptor rekrutiert und nachgeschaltete Rezeptor-assoziierte Smads (R-Smads) phosphoryliert (Meng et al. 2015). Über den Smad Signalweg stimuliert TGF β die Produktion der Extrazellulärmatrix in Mesangiumzellen, in tubulären Epithelzellen und in Fibroblasten in der Niere und vermindert die Synthese von Extrazellulärmatrix Protease Inhibitoren. Deshalb spielt TGF β eine wichtige Rolle bei der Nierenfibrose (Kurihara und Sakai 2017).

Zu den durch den TGF β -Rezeptor aktivierten R-Smads zählen Smad2 und 3, die in phosphorylierter Form einen oligomeren Komplex mit Smad4 bilden und in den Zellkern translozieren. Dort regulieren die Smad-Komplexe die Transkription von Zielgenen in Kooperation mit verschiedenen Aktivatoren und Repressoren (Meng et al. 2015; Lan 2011). Meng et al. konnte beispielsweise zeigen, dass Smad3 den Promotor fibrotischer Gene wie beispielsweise Kollagen I aktiviert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Smad2 die Smad3-abhängige Fibrose über eine Hochregulation von Smad3 weiter verstärkt (Meng et al. 2010). Mittels Inhibition von Smad3 dagegen kann eine durch Streptozotocin ausgelöste, diabetische Nephropathie abgemildert werden (Li et al. 2010).

Des Weiteren wird das inhibitorische Smad7 aktiviert. Smad7 konkurriert mit den R-Smads um die Bindung an den aktivierten Rezeptoren. Durch die Bindung an den Rezeptoren übt Smad7 einen inhibitorischen Effekt auf den Smad-Signalweg aus (Meng et al. 2015; Lan 2011). Smad7 bindet dazu an den Typ I TGF β -Rezeptor und rekrutiert eine Serin/Threonin-Phosphatase (Shi et al. 2004) und die E3-Ligase Smurf2, die eine Dephosphorylierung und damit Inaktivierung, sowie die Degradation des Rezeptors durch Endozytose bewirken (Di Guglielmo et al. 2003). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Smad7 bei der Entstehung von renaler Fibrose eine entscheidende Rolle spielt. So konnte Chung et al. beobachten, dass eine Deletion von Smad7 eine stärkere Ausbildung der Fibrose und der Entzündung der Niere in Folge von UUO bewirkt. Diese Ergebnisse wurden vor allem durch ein Fehlen der Inhibition durch Smad7

hervorgerufen, was zu einer Verstärkung des TGF β -/Smad-Signalweges und vermehrter CTGF (*connective tissue growth factor*)-Expression führt (Chung et al. 2009).

TGF β zählt deshalb zu den Zytokinen, die im Verlauf der renalen Fibrose eine Schlüsselrolle spielen, da die Expression in der entzündeten Niere vermehrt stattfindet. Dies führt zu einer vermehrten Produktion der Extrazellulärmatrix und gleichzeitig zur Inhibition der MMPs, wodurch der Abbau der Extrazellulärmatrix inhibiert wird. Außerdem werden durch TGF β Fibroblasten aktiviert, sowie die Transdifferenzierung von Epithelzellen zu Myofibroblasten vermittelt. Mesangiumzellen werden zur Proliferation und zum Matrixaufbau aktiviert. Tubuläre Epithelzellen und Podozyten werden im Gegensatz dazu zur Elimination geführt. Diese Vorgänge führen in Kombination zu einer Verschlechterung der renalen Fibrose (Meng et al. 2015; Vega et al. 2016; López-Hernández und López-Novoa 2012). Die pro-fibrotische Wirkung von TGF β konnte sowohl durch Inhibition als auch durch Überexpression bestätigt werden. Miyajima et al. konnten zeigen, dass durch die Behandlung mit Anti-TGF β -Antikörpern die Entstehung tubulärer Fibrose durch UUO vermindert werden kann (Miyajima et al. 2000). Umgekehrt konnten Mozes et al. zeigen, dass durch eine Überexpression von TGF β ein vermehrter Aufbau und ein verminderter Umbau von Extrazellulärmatrix zu beobachten war (Mozes et al. 1999). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in Mesangiumzellen ebenfalls über S1P (siehe 1.4 Sphingolipide) eine Aktivierung des TGF β -Signalweges stattfindet. Diese Aktivierung führt zu einer Smad-vermittelten Expression von CTGF (Xin et al. 2004). CTGF ist ein matrizelluläres Protein, das sezerniert wird. Es besitzt vier Domänen. Domäne 1 ist homolog zu IGF-1 (*insuline-like growth factor-1*) Bindeproteine, Domäne 2 zu Von-Willebrand-Faktor Typ C, Domäne 3 zu Thrombospondin Typ 1 und Domäne 4 enthält ein Cystein-Knotenmotiv wie in Proteinen, die an Heparan-Sulfat-Proteoglykane binden. Dabei ist CTGF kein traditioneller Wachstumsfaktor oder Zytokin, da es keinen eigenen Rezeptor zu haben scheint. Das matrizelluläre Protein moduliert die Interaktion der Zellen mit ihrer Matrix um den zellulären Phänotyp zu modifizieren. CTGF interagiert dafür mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie IGF-1, BMP (*bone morphogenic proteins*) 4 und 7, TGF β und VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Es spielt eine wichtige Rolle in Krankheiten, bei denen Gewebsumbau vorkommt, da es Myofibroblasten aktiviert und den Aufbau der Extrazellulärmatrix stimuliert. Dieser Gewebsumbau führt zu Fibrose (Lipson et al. 2012).

1.4. Sphingolipide

Sphingolipide sind ubiquitär vorkommende Komponenten der Säugetiermembran, die nicht nur eine strukturelle Funktion haben, sondern einige Subspezies auch als Signalmoleküle wirken können. Letztere spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse (Maceyka et al. 2012). Der deutsche Chirurg Johann L. W. Thudichum isolierte und charakterisierte diese Klasse der Lipide erstmals im Jahr 1884 und benannte sie nach der

griechischen Sphinx wegen ihrer mysteriösen Struktur (Futerman und Hannun 2004; Huwiler et al. 2000).

1.4.1. Struktur und Stoffwechsel

Strukturell werden Sphingolipide durch ihr sphingoides Rückgrat definiert, das in Säugetieren Sphingosin (2S,3R,4E)-2-amino-1,3-dihydroxy-4-Oktadecen bildet. Die *de novo* Biosynthese der Sphingolipide (Abb. 7) findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat statt. Den initialen Schritt bildet die Kondensation von Palmitoyl-Coenzym A mit L-Serin zu 3-Ketosphinganin durch die Serin-Palmitoyl-Transferase. Nach der Reduktion zu D-Erythro-Sphinganin durch die NADH-abhängige 3-Ketosphinganin-Reduktase, wird es durch die Sphinganin-N-Acyltransferase zu Dihydroceramid acyliert. Durch eine Desaturierung mittels Dihydroceramid-Desaturase entsteht Ceramid (Huwiler et al. 2000; Hait et al. 2006; Pitson 2011).

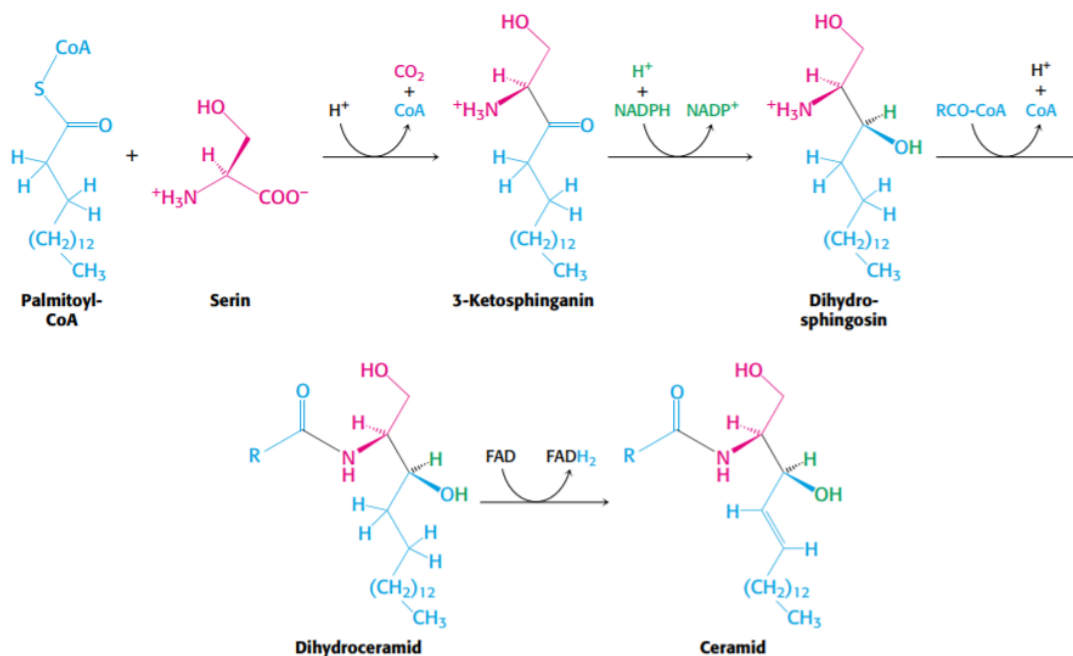


Abb. 7: Sphingolipid-Stoffwechsel

Die Kondensation von Palmitoyl-Coenzym A mit L-Serin zu 3-Ketosphinganin wird durch die Serin-Palmitoyl-Transferase katalysiert. Durch die NADH-abhängige 3-Ketosphinganin-Reduktase wird 3-Ketosphinganin reduziert zu D-Erythro-Sphinganin. Dieses wird anschließend durch die Sphinganin-N-Acyltransferase zu Dihydroceramid acyliert. Mittels Dihydroceramid-Desaturase entsteht aus Dihydroceramid Ceramid (Berg et al. 2013).

Ceramid und Dihydroceramid können durch die Sphingomyelin-Synthase zu Sphingomyelin und Dihydro-sphingomyelin umgewandelt werden, sowie zu Glukosylceramid und Dihydroglukosylceramid. Im Lumen des Golgi-Apparats kann aus Glukosylceramid Lactosylceramid und andere komplexe Sphingolipide entstehen (Hait et al. 2006). Da Ceramid im Zentrum steht, kann es ebenfalls durch die Ceramidasen zu Sphingosin deacetyliert werden. Sphingosin kann nun durch die Sphingosinkinase zu S1P phosphoryliert werden.

Die zuvor genannten Reaktionen sind reversibel und nur durch die S1P-Lyase kann S1P irreversibel zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin abgebaut werden (Huwiler et al. 2000; Pitson 2011).

Einer der wichtigsten Metabolite dabei ist S1P, das an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen durch die Förderung des Zellwachstums und der Zellmigration, sowie der Hemmung von Apoptose beteiligt ist (Maceyka et al. 2012; Schwalm et al. 2013). Die Spiegel von S1P werden durch die produzierenden Enzyme (SK1 und SK2) und die dephosphorylierenden Phosphatasen (SPP1 und SPP2), sowie durch die S1P-Lyase reguliert (Maceyka et al. 2012; Pitson 2011). Intrazellulär gebildetes S1P kann über verschiedene Transporter, wie ABCA1, ABCC1, ABCG2 und Spinster 2, in den Extrazellulärraum sezerniert werden. S1P kann dort autokrin oder parakrin an die fünf S1P-Rezeptoren S1PR₁₋₅ binden. Diese gehören der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) an, wodurch die Signalwege der Mitogen-aktivierte Protein Kinase, des Phosphoinositol-3-Phosphat/Akt und der Phospholipase C/Diacylglycerol/Proteinkinase C aktiviert werden (Abb. 8) Diese Aktivierung führt zu verschiedenen zellulären Antworten wie Proliferation, Extrazellulärmatrixaufbau, Stimulation von adhärenen Zell-Zellverbindungen, die Bildung von Stressfasern und die Hemmung von Apoptose (Hait et al. 2006; Schwalm et al. 2013). Dabei können die zellulären Antworten durch die unterschiedliche Expression der S1P-Rezeptoren und die verschiedenen G-Proteine, an die die Rezeptoren koppeln, variieren (Abb.8) (Schwalm et al. 2013).

Der S1P₁-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und veranlasst die Ummantelung von Gefäßen durch glatte Muskelzellen. Außerdem schützt die Aktivierung des S1P₁-Rezeptors, möglicherweise auch zusammen mit dem S1P₂- und S1P₃-Rezeptor, die Integrität der Endothel- und der Epithelbarriere. Als weitere Aufgabe sorgt der S1P₁-Rezeptor für die Ausschüttung der Lymphozyten aus den Lymphknoten. Der S1P₂-Rezeptor wird benötigt für die Ausbildung des Gehörs und das vestibuläre System. Außerdem wirkt er als Gegenspieler zu S1P₁- und S1P₃-Rezeptoren, indem er die Migration verhindert. Der S1P₃-Rezeptor reguliert zusätzlich zu den bereits genannten Aufgaben den Puls. Während die Deletion der S1P_{1,2,3}-Rezeptoren tödlich wirkt, scheinen die S1P₄- und S1P₅-Rezeptoren nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Eine S1P₄-Rezeptor-Stimulation führt zu Neuordnung des Zytoskeletts und zu Zellrundung. Außerdem spielt die Aktivierung des Rezeptors eine Rolle bei Immunzellen. Die Aktivierung vom S1P₅-Rezeptor führt zu einer Inhibition von ERK (*extracellular signal regulated kinase*)1/2 und letztendlich zu einer Hemmung der Proliferation (Strub et al. 2010).

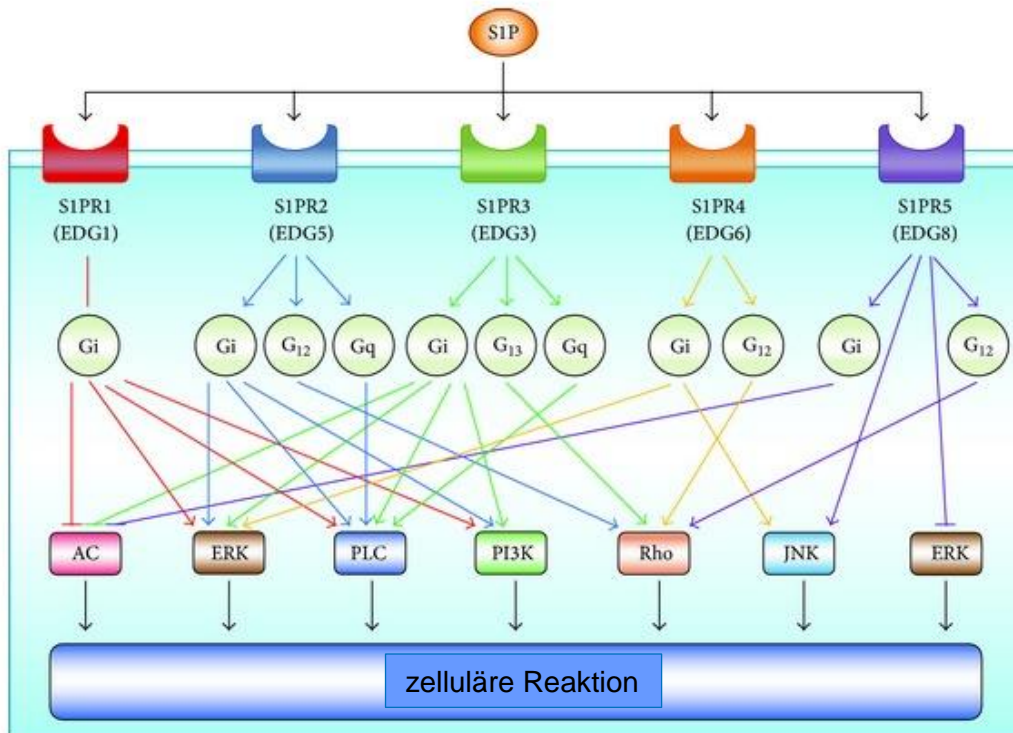


Abb. 8: Signalwege der S1P-Rezeptoren

S1P ist ein Ligand für fünf verschiedene S1P-Rezeptoren, die an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt sind. Diese aktivieren oder inhibieren die nachfolgenden Signalwege wie Adenylzyklase-zyklisches AMP (AC), extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK), Phospholipase C (PLC), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die kleinen GTPasen der Rho-Familie und die c-Jun Amino-Terminal-Kinase (JNK). Modifiziert nach (https://www.researchgate.net/figure/264832147_fig2_Downstream-signaling-pathways-of-sphingosine-1-phosphate-S1P-receptors-S1P-is-a-ligand).

S1P spielt beispielsweise eine wichtige, proinflammatorische Rolle, da es die Freisetzung der Lymphozyten aus sekundärem Lymphgewebe aktiviert und zum entzündeten Gewebe leitet. Dies erfolgt über den S1P₁-Rezeptor der Lymphozyten, die dem Konzentrationsgefälle von wenig S1P im Lymphknoten hin zu hohen S1P Konzentrationen im entzündeten Gewebe folgen. Dieser Vorgang kann durch FTY720 (Fingolimod, Gilenya®), einem Sphingosin-Analogon, verhindert werden (Schwalm et al. 2014). FTY720 wird durch die SK2 phosphoryliert und ist in diesem Zustand ein Agonist für die S1P_{1,3,4,5}-Rezeptoren. Allerdings kann FTY720 auch als funktioneller S1P₁-Rezeptor-Antagonist zu Internalisierung und Abbau des Rezeptors führen und so die Ausschüttung der Lymphozyten verhindern. Auf Grund dieser Wirkung wird FTY720 als Medikament bei der Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt (Chun und Brinkmann 2011).

S1P kann neben seinen extrazellulären Wirkungen auch intrazelluläre Wirkungen aufweisen. Über die intrazellulären Aufgaben des S1P ist bisher nicht viel bekannt (Schwalm et al. 2013). Ein identifiziertes Zielprotein ist die Ceramidsynthase-2, die über einen negativen *feedback loop* die Bildung von Ceramid als Vorläufer von S1P inhibiert (Laviad et al. 2008). Hait et al.

konnten weiterhin zeigen, dass durch SK2 synthetisiertes S1P im Kern die Histondeacetylasen HDAC1 und -2 direkt inhibiert werden, was zu einer Reduktion ihrer Aktivität führt (Hait et al. 2009). Als weitere Wirkung von intrazellulärem S1P gilt die Bindung an den zytosolischen TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 2 (TRAF2), der essentiell ist für die Ligase-Aktivität des NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Signalweges (Alvarez et al. 2010).

Im Gegensatz zum pro-proliferativen S1P initiieren die Vorläuferlipide Ceramid und Sphingosin die Apoptose. Durch diese gegensätzlichen Funktionen muss eine Balance zwischen dem pro-apoptotischen Ceramid und dem pro-proliferativen S1P hergestellt werden. Dies wird als Sphingolipid-Rheostat bezeichnet und spielt somit eine wichtige Rolle bei Zellantworten. Die Sphingosinkinasen sind dabei ein zentraler Regler dieses Gleichgewichts, da sie eine Brücke zwischen Ceramid und S1P bilden (Pitson 2011).

1.4.2. Sphingosinkinasen

Es gibt zwei Isoformen der Sphingosinkinase, SK1 und SK2, die beide die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P katalysieren. Trotzdem gibt es vermehrt Befunde, dass die beiden Kinasen gegensätzliche Funktionen aufweisen. Während die SK1 Proliferation und Zellwachstum aktiviert, vermindert die SK2 Zellwachstum und aktiviert die Apoptose. Eine mögliche Erklärung dafür ist die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der Kinasen, sowie der subzelluläre Wirkort des so gebildeten S1P (Maceyka et al. 2005).

Die SK1 wurde zuerst von Olivera et al. 1998 aus Rattennieren isoliert und weist eine molekulare Masse von 49 kDa auf. Es wurden fünf hochkonservierte Domänen C1-C5 entdeckt. C1-C3 beinhalten eine katalytische DAG-Kinasen-Domäne, während C4 eine spezifische Domäne in der Sphingosinkinase darstellt (Kohama et al. 1998). Im Menschen wurden drei verschiedene Varianten der SK1 entdeckt, SK1a, SK1b, und SK1c mit 384, 399 und 470 Aminosäuren, wobei SK1b am häufigsten in der Plasmamembran zu finden ist (Alemany et al. 2007). Die SK1 wird durch verschiedene Agonisten aktiviert, dazu zählen Wachstumsfaktoren, Hormone, proinflammatorische Zytokine, Lipopolysaccharide, Ligation der IgG und IgE Rezeptoren und einige GPCR-Liganden. Viele dieser Agonisten induzieren eine Phosphorylierung am Serin 225 der SK1 durch ERK. Dies führt zu einer Translokation der SK1 vom Zytosol zur Plasmamembran, in der sich das Substrat Sphingosin befindet (Maceyka et al. 2012; Pitson 2011). Die SK1 bewirkt in der Zelle Proliferation und Wachstum, sowie den G1/S-Übergang im Zellzyklus und schützt vor Apoptose. Daher wird die SK1 mit der Tumorbildung in Zusammenhang gebracht. Es konnte auch gezeigt werden, dass Krebszellen eine erhöhte SK1-Expression aufweisen und dass eine starke Korrelation zwischen erhöhten SK1-Spiegeln und schlechter Prognose, Verminderung von

Überlebenschance und fortgeschrittenem Tumorstadium besteht (Maceyka et al. 2005; Pyne und Pyne 2010; Döll et al. 2007).

Im Zusammenhang mit diabetischer Nephropathie dagegen wurde die vermehrte Aktivierung der SK1 durch TGF β als eine Schutzfunktion der Niere erkannt. Dies wird durch die vermehrte SK1-Aktivität und die damit verbundene Verminderung des Fibrosemarkers CTGF hervorgerufen (Ren et al. 2009).

Das Augenmerk dieser Arbeit liegt allerdings auf der SK2, über deren Funktion bisher noch nicht viel bekannt ist. Die SK2 wurde das erste Mal im Jahr 2000 von Liu et al. beschrieben. Sie enthält 236 zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zur SK1 (Liu et al. 2000). Es wurden zwei Varianten identifiziert, SK2-S und SK2-L, die sich in ihrem N-Terminus unterscheiden (Okada et al. 2005). Die fünf hoch konservierten Regionen C1-C5 wurden ebenfalls in der SK2 identifiziert. Die Regionen C1-C4 weisen dabei eine Identität von 47% und eine Gemeinsamkeit von 79% mit der SK1 auf, C5 eine Identität von 43% und eine Gemeinsamkeit von 78% mit der SK1. Während die SK1 hauptsächlich in Lunge, Milz, Leber und Niere exprimiert ist, ist die Expression der SK2 ebenfalls in der Leber, im Herzen und in der Niere hoch (Olivera et al. 1998; Liu et al. 2000). Durch eine transiente Transfektion beider Sphingosinkinasen in HEK293 Zellen konnte eine geringere und verkürzte Aktivität der SK2 im Vergleich zur SK1 aufgezeigt werden (Liu et al. 2000). Weitere Unterschiede in der Aktivität der beiden Kinasen zeigten sich durch die Zugabe von Salzen. Während die SK1 durch NaCl (Natriumchlorid) und KCl (Kaliumchlorid) inhibiert wird, stimuliert ihre Zugabe die Aktivität der SK2. Umgekehrt verhält es sich mit dem Detergenz Triton X-100. Es inhibiert die Aktivität der SK2 und aktiviert dagegen die SK1. Diese Gegensätze können genutzt werden um die unterschiedlichen Aktivitäten der SK1 und -2 zu untersuchen. Insgesamt weisen die Unterschiede in der Gewebeexpression, zellulärer Lokalisation und Aktivität im Zusammenhang mit Salzen und Detergenzien auf unterschiedliche Funktionen der SK hin und lässt vermuten, dass durch SK gebildetes S1P oder durch SK2 gebildetes S1P unterschiedliche Wirkungen haben kann (Liu et al. 2000). Liu et al. konnten weiterhin zeigen, dass die SK2 eine apoptotische Wirkung aufweist, die unabhängig von den S1P-Rezeptoren ist. Durch eine Überexpression von SK2 wird die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien erhöht und die Aktivität der Caspase-3 gefördert, was zur Apoptose führt. Mechanistische wurde dies erklärt durch ein BH3-Motif, das die SK2 aufweist. Das BH3-Motif bindet dabei Bcl-xL und inhibiert dadurch die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-xL, was zur Einleitung der Apoptose führt (siehe 1.1.3) (Liu et al. 2003). Diese Funktion der SK2 ist möglich durch die Lokalisation am ER durch die BH3 Domäne (Maceyka et al. 2005). Dies geht einher mit der Beobachtung, das BH3-*only* Proteine über die BH3 Domäne am ER lokalisiert sind um den Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien zu stimulieren (Germain et al. 2002).

Durch die Überexpression der SK2 in humanen und murinen Zellen konnte gezeigt werden, dass die SK2 durch ein nukleares Lokalisationssignal im Kern lokalisiert sein kann. Des Weiteren konnte durch die Überexpression eine verminderte DNA-Synthese beobachtet werden (Igarashi et al. 2003). Hait et al. konnten zeigen, dass die SK2 im Zellkern S1P produziert, welches die Histondeacetylasen hemmt und damit Einfluss auf die Genexpression nimmt (Hait et al. 2009). Dabei ist allerdings nur wenig über die Expression und die Aktivität der SK2 bekannt. Mizutani et al. konnten beobachten, dass *in vitro* ein Mangel an Serum zu verstärkter SK2 Expression führt. Die erhöhte Expression wird über C-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) vermittelt. Diese aktivieren CREB (*cAMP response element-binding protein*) durch Phosphorylierung, was zu einer erhöhten SK2 Transkription führt (Mizutani et al. 2015). Durch die Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) erfolgt eine Phosphorylierung im nuklearen Exportsignal und die SK2 verlässt den Zellkern. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass das nukleare Exportsignal der SK2 eine entscheidende Rolle bei der Lokalisation spielt. Diese Phosphorylierung wird durch die Proteinkinase D (PKD, PKC- μ) im Zellkern katalysiert. Dies ist möglich, da die PKD durch Stimulation mit PMA in den Zellkern transloziert (Ding et al. 2007).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Rolle des Sphingolipid-Metabolismus bei fibrotischen Nierenerkrankungen. Genauer sollte dabei auf das Enzym SK2 eingegangen werden.

Grundlage dafür bildete die Veröffentlichung von Ren et al. 2009. Dort konnte gezeigt werden, dass die SK1 eine protektive Rolle in der Entstehung der Nierenfibrose spielt. Sowohl durch einen pro-fibrotischen Stimulus *in vitro*, als auch bei Patientenproben *in vivo* konnte eine vermehrte SK1 Aktivität detektiert werden. Weiterhin konnte durch die Deletion der SK1 eine erhöhte Expression von Fibrosemarkern beobachtet werden. Als weitere Grundlage diente die Veröffentlichung von Hofmann et al. 2008, in der eine gegensätzliche Rolle der SK1 und 2 in Mesangiumzellen beobachtet wurde. Da über die SK2 bisher nur wenige Daten vorliegen, sollte der Fokus dieser Arbeit auf der Charakterisierung der SK2 bei fibrotischen Nierenerkrankungen liegen.

Dazu wurden Mäuse verwendet, die einerseits eine Deletion des murinen Sphk2 Gens SK2 haben (SK2^{-/-}), und andererseits eine Überexpression der humanen SK2 (hSK2) aufweisen (hSK2 tg). Mit Hilfe dieser beiden Mauslinien sollte untersucht werden, welchen Einfluss die SK2 und die durch dieses Enzym regulierten Sphingolipide auf die physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen in der Niere nehmen.

Wie unter 1.1.2 beschrieben, spielen Mesangiumzellen eine wichtige Rolle bei Nierenerkrankungen. Aus diesem Grund wurde dieses Zellmodell gewählt und Mesangiumzellen aus den hSK2 überexprimierenden Mäusen und deren Kontrollen isoliert und untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Detektion einer Abweichung der Zellantwort der genetisch modifizierten Zellen hinsichtlich Proliferation und Apoptose. Diese Vorgänge spielen eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung fibrotischer Nierenerkrankungen.

Da die Entstehung von Nierenerkrankungen nicht nur auf einen Zelltyp zurück zu führen ist und *in vitro* Daten keine Aussage über die *in vivo* Relevanz geben, wurde für die weitere Untersuchung das *in vivo* Modell der tubulointerstitiellen Fibrose (UUO) verwendet (siehe 1.2). Dazu wurden sowohl die Mäuse mit einer SK2 Deletion als auch die SK2 überexprimierenden Mäuse verglichen mit ihren jeweiligen Kontrollen. Als korrespondierende Zellkulturmodelle wurden hierzu humane proximale tubuläre Epithelzellen (HK2) und Nierenfibroblasten verwendet. Diese Ansätze sollten dazu dienen, die Beteiligung der SK2 bei Nierenfibroseprozessen zu klären und um die Möglichkeit zu überprüfen, ob SK2 als neuer Angriffspunkt bei solchen Nierenerkrankungen dienen könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Tab. 1: Allgemeine Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Chloroform, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumhydroxid (NaOH), Paraformaldehyd	Merck, Schwalbach
Entellan® Neu	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS), Bromphenolblau, Bovines Serumalbumin (BSA, fettsäurefrei), Diethylpyrocarbonat (DEPC), Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N-N'-N'-N'-tetraessigsäure (EGTA), D-Glucose-Monohydrat, Glycerol, Isopropanol, Magnesiumchlorid (MgCl ₂), Methanol, Natriumchlorid (NaCl), Natriumfluorid (NF), Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄), Natriumpyrophosphat, Ponceau S, Salzsäure, Sirius Red F3B „Direct Red 80“, Tetramethylethylendiamin (TEMED), Trichloressigsäure, Trizma® base (Tris Base), Triton-X100, Tween-20, TRI Reagent® RNA Isolation Reagent, β-Glycerophosphat, β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anilinblau, Azokarmin, Orange G, Phosphorwolframsäure, Wasserstoffperoxid Lösung 30 wt % in H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitor-Cocktail Complete®	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1), 1-Butanol, Calciumchlorid, Glycin, Roti®-Histofix (4% phosphatgepufferte Formaldehydlösung) Roti®-Quant,	Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS), Perjodsäure, Schiff'sches Reagenz	
Pferdeserum	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Magermilchpulver	Naturaflor, Dietmannsried
Molekulargewichtsmarker (Protein)	Biomol, Hamburg
Szintillationscocktail (Lumasafe™ PLUS)	PerkinElmer, Rodgau
BSA (Albumin Standard), Dimethylsulfoxid (DMSO), Xylol	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
Essigsäure, Kaliumchlorid	KMF optichem, Lohmar
Mayer's Hematoxilin, Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt

2.1.2. Zellkulturreagenzien und -stimulanzen

Tab. 2: Zellkulturreagenzien und -stimulanzen

Reagenzien und Stimulanzen	Hersteller
Aprotinin	Roche Biochemicals, Mannheim
BSA, fettsäurefrei	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) 4,5 g/L D-Glukose, +GlutaMax™, - Pyruvat	Life Technologies, Darmstadt
DMEM/F-12 (1:1) (1x) + L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (PBS), -Ca ²⁺ , -Mg ²⁺	Life Technologies, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
γ-[³² P]ATP (Adenosintriphosphat) (9,25 MBq, 250 µCi/mL)	PerkinElmer, Rodgau
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	Roche Biochemicals, Mannheim
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumselenit-Pentahydrat	Merck, Schwalbach
OptiMEM	Life Technologies, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (10000 U/mL)	Life Technologies, Darmstadt
Phenylmethylsulfonidfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, +GlutaMax™	Life Technologies, Darmstadt
Sphingosinkinase-Inhibitor (SKI) II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sphingosin	Biomol Chemikalien GmbH, Hamburg
Staurosporin	Merck, Schwalbach
<i>Transforming growth factor</i> (TGF)β	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Tumor necrosis factor</i> (TNF)α	PeptoTech Inc., Rocky Hill, NJ, US
Transferrin	Roche Biochemicals, Mannheim
Trypanblau 0,4%	Bio-Rad, München
0,05% Trypsin/EDTA	Life Technologies, Darmstadt

2.1.3. Verwendete Medikamente für die Maus-Versuche

Tab. 3: Verwendete Medikamente für die Maus-Versuche

Medikament	Hersteller
Temgesic 0,3 mg/1 mL Burprenorphin Injektionslösung PZN -345928	Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA
Heparin-Natrium 25000 I. E./5 mL PZN -03029843	Ratiopharm, Ulm
Ketavet 100 mg/1 mL Ketaminhydrochlorid Injektionslösung PZN -03151811	Pfizer AG, Zürich, Schweiz
Narcoren 16 g/ 100 mL Pentobarbital- Natrium Injektionslösung PZN -11336163	Merial GmbH, Lyon, Frankreich
Rompun 2% Xylazin Injektionslösung PZN -1320422	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Forene 100% (V/V) Isofluran Flüssigkeit zur Herstellung eines Dampfes zur Inhalation PZN -10182054	AbbVie, Wiesbaden

2.1.4. Zusammensetzung der Zellkulturmedien

HK2-Zellen:

Wachstumsmedium:

500 mL DMEM/F-12 (1:1) (1x) + L-Glutamin

10% FCS

5 mL Penicillin-Streptomycin (10000 U/mL)

7,5 mL HEPES

5 ng/mL Natriumselenit

100 µg/mL Transferrin

3 mg/mL Insulin

Hungermedium:

DMEM 4,5 g/L D-Glukose, +GlutaMax™, -Pyruvat

0,1 mg/mL BSA/PBS (fettsäurefrei)

5 mL HEPES

Einfrier-Medium:

45% Wachstumsmedium

45% FCS

10% DMSO

Maus-Mesangiumzellen:

Wachstumsmedium:

500 mL RPMI 1640, +GlutaMax™

10% FCS

100 Einheiten/mL Penicillin

100 µg/mL Streptomycin

10 mM HEPES

5 ng/mL Natriumselenit

5 µg/mL Transferrin

6 µg/mL Insulin

4,5 µg/mL β-Mercaptoethanol

Hungermedium:

500 mL DMEM

0,1 mg/mL BSA/PBS (fettsäurefrei)

Einfrier-Medium:

45% Wachstumsmedium

45% FCS

10% DMSO

2.1.5. Antikörper

Tab. 4: Verwendet Erst-Antikörper

Erst-Antikörper	Hersteller
Anti- α -SMA Klon 1A4 (Maus, monoklonal, 1:5000, A2527)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Akt (Kaninchen, polyklonal, 1:100, #9272)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti- β -Aktin (Ziege, polyklonal, 1:3000, sc-1616)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Bcl-xL (Kaninchen, polyklonal, 1:1000, #2762)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Calreticulin (Kaninchen, monoklonal, 1:1000, #12238)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Caspase-3 gespalten (Kaninchen, polyklonal, 1:500, #9662)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Caspase-9 gespalten (D353) (Kaninchen, polyklonal, 1:1000, #9509)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-CTGF (Ziege, polyklonal, 1:1000, sc-14939)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti- <i>Extracellular signal-regulated Kinase</i> (ERK) 1/2 (Kaninchen, polyklonal, 1:1000, #9102)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-F4/80 Klon Cl:A3-1 (Maus, monoklonal, 1:200, MCA497R)	Bio-Rad, München
Anti-Fibronektin 1 (Kaninchen, polyklonal, 1:000, F3648)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase) (Ziege, polyklonal, 1:1000, sc-20357)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Kollagen 1 (Kaninchen, polyklonal, 1:1000, AB765P)	Millipore, Darmstadt
Anti-Lamin B (C-20) (Ziege, polyklonal, 1:500, sc-6216)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PARP gespalten (Kaninchen, polyklonal, 1:1000, #9542)	Cell Signaling, Frankfurt

Anti-Phospho-Akt (Kaninchen, polyklonal, 1:1000, #9271)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Phospho-ERK 1/2 (Maus, monoklonal, 1:1000, #9106)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Phospho-Smad2 (Ser465/467) (Kaninchen, polyklonal, 1:1000, #3101)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Phospho-Smad3 (Ser423/425) (Kaninchen, monoklonal, 1:1000, #9520)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Plasminogen-Aktivator Inhibitor (PAI)-1 (Kaninchen, polyklonal, 1:1000, sc-8979)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Smad2 (Maus, monoklonal, 1:1000, #3103)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Smad3 (Kaninchen, monoklonal, 1:1000, #9523)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Smad7 (B-8) (Maus, monoklonal, 1:1000, sc-365846)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-SK1 murin #13 NM_0200011 Synthetisches Peptid: CPRGLLRPCRVLV (Kaninchen, 1:500)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Anti-SK2 flow through #66 human NM_020126 Synthetische Peptide: NGHLEAEEQQDQRPD, CLPGDGEITPDLLPRP (Kaninchen, 1:1000)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Anti-SK2 human (Kaninchen, polyklonal, 1:200)	ECM Biosciences, Versailles, KY, USA
Anti-SK2 #26 murin NM_020011 Synthetische Peptide: CTLLTGPAAGQKPQA, CPIAEGPPEMPASSGF (Kaninchen, 1:1000)	Eurogentec, Seraing, Belgien

Tab. 5: Verwendete Zweit-Antikörper

Zweit-Antikörper	Hersteller
Anti-Maus-Immunglobulin G (IgG) (Schaf, HRP-gekoppelt, 1:5000)	GE Healthcare, München
Anti-Kaninchen-IgG (Esel, HRP-gekoppelt, 1:5000)	GE Healthcare, München
Anti-Kaninchen-IgG (Ziege, 1:30)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Ziege-IgG (Esel, HRP-gekoppelt, 1:5000)	Santa Cruz, Heidelberg
Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase (Kaninchen, 1:5)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Histofine Simple Stain Mouse Max PO Rat 414311F	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan

2.1.6. siRNA-Oligonukleotide

ON-TARGETplus Control D-001810

Dharmacon, Lafayette, CO, USA

ON-TARGETplus SMARTpool Human Sphk2 L-004831

Dharmacon, Lafayette, CO, USA

2.1.7. Taqman®-Sonden

Tab. 6: Verwendete Sonden

Sonde	Hersteller
18S Hs99999901_s1	Life Technologies, Darmstadt
Kollagen Col1a1 Mm00801666_g1	
CTGF Mm01192933_g1	
Fibrotnektin 1 Mm01256744_m1	
Murine SK2 Mm00445021_m1	
Humane SK2 Hs00219999_m1	

Smad7 Mm00484742_m1	
S1P ₁ -Rezeptor Mm02619656_s1	
S1P ₂ -Rezeptor Mm02620208_s1	
S1P ₃ -Rezeptor Mm02620181_s1	
S1P ₄ -Rezeptor Mm00468695_s1	
S1P ₅ -Rezeptor Mm02620565_s1	

2.1.8. Enzyme, Reagenzien

Tab. 7: Verwendete Enzyme und Reagenzien

Enzym/Reagenz	Hersteller
ABsolute™ Blue QPCR Low ROX Mix	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
Dako Antibody Diluent with Background-Reducing Components S3022	Agilent, Ratingen
Dako Goat Serum	Agilent, Ratingen
Dako Real Target Retrieval Solution 10x Citrate pH 6 Concentrate 2031	Agilent, Ratingen
dNTP Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Immobilion™ Western Blot Chemiluminescent HRP Substrat	Merck, Schwalbach
Lipofectamin 2000	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
RevertAid™ Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
Roti®-Quant	Roth, Karlsruhe

5x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
TRIZOL Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.9. Puffer- und Lösungszusammensetzungen

2.1.9.1. Puffer für die Bestimmung zellulärer Parameter

Sphingosin Kinase Puffer:

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

20% Glycerol

1 mM β -Mercaptoethanol

1 mM EDTA

1 mM Na_3VO_4

40 mM β -Glycerophosphat

15 mM NaF

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinin

10 mM PMSF

Für die SK1-Aktivitätsmessung 0,5% Triton-X 100 zugeben.

Für die SK2-Aktivitätsmessung 1M KCl zugeben.

Sphingosin als Substrat:

1 mM Sphingosin

4% BSA/PBS

Extraktionspuffer:

Chloroform/Methanol/HCl 100:200:1, v/v

Laufmittel:

1-Butanol/Ethanol/Essigsäure/Wasser 80:20:10:20, v/v

2.1.9.2. Puffer und Lösungen für die RNA-Analyse

DEPC-Wasser:

1 mL Diethylpyrocarbonat ad 1 L Milli-Q-Wasser über Nacht rühren lassen und anschließend autoklavieren

75% Ethanol-Lösung:

75 mL Ethanol (puriss.) ad 100 mL DEPC-Wasser

2.1.9.3. Puffer und Lösungen für die Protein-Analyse

Lysispuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

150 mM NaCl

10% Glycerin

2 mM EDTA

2 mM EGTA

50 mM NaF

10 nM Natriumpyrophosphat

2 mM DTT

200 μ M Na₃VO₄

1% Triton-X 100

40 mM β -Glycerophosphat

200 μ L Protease-Inhibitor-Cocktail-Lösung zu 4,8 mL Lysispuffer kurz vor Anwendung zugeben

Protease-Inhibitor-Cocktail-Lösung:

1 Tablette Complete® in 2 mL doppelt destilliertes Wasser

70% Trichloressigsäure:

70 g Trichloressigsäure

ad 100 mL destilliertes Wasser

SDS-Denaturierungs- und Ladepuffer (4x):

12,5% SDS

40% Glycerin

5% Bromphenolblau

20% β -Mercaptoethanol

100 mM Tris-HCl (pH 6,8)

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)-Laufpuffer (10x Ansatz)

60,57 g Tris-Base

288,27 Glycin

20 g SDS

ad 2 L destilliertes Wasser

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer:

30,28 g Tris-Base
ad 500 mL destilliertes Wasser
mit konzentrierter HCl-Lösung pH 6,8 einstellen

SDS-PAGE-Trenngelpuffer:

90,85 g Tris-Base
ad 500 mL destilliertes Wasser
mit konzentrierter HCl-Lösung pH 8,8 einstellen

Transferpuffer für Western Blot:

25 mM Tris-HCl (pH 7,4)
192 mM Glycin
10% Methanol

Ponceau S-Lösung:

0,2 g Ponceau S
3 g Trichloressigsäure
100 mL destilliertes Wasser

Milchpulverlösung (5%):

5 g Magermilchpulver in 100 mL PBST

Blockierungspuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
200 mM NaCl
2% Triton-X 100
3% BSA
10% Pferdeserum

2.1.9.4. Allgemeine Lösungen

PBS:

8 g NaCl
0,2 g KCl
0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat
1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat
ad 1 L destilliertes Wasser

PBST:

PBS mit 0,1% Tween 20

TBS

6,1 g Tris

8,7 g NaCl

pH 7,6

2.1.9.5. Kits und Assays

Alkaline Phosphatase Permanent AP Red Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Avidin/Biotin <i>Blocking Kit</i> SP-2001	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
<i>Cell Death Detection</i> ELISA PLUS	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>DAB Peroxidase Substrat Kit</i> SK-4100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
<i>Mouse on mouse (M.O.M.TM) Elite Peroxidase Kit</i>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
<i>Nuclear Extraction Kit</i>	Abcam, Cambridge, GB
<i>Vectastain® Elite® ABC-HRP Reagent, R.T.U. (Peroxidase, Ready-to-Use)</i> PK-7100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.1.9.6. Verbrauchsmaterialien

Amersham HyperfilmTMECL von GE Healthcare, München

BD Microlance 3 22G 1¼“ -Nr. 12 0,7 x 30 mm, Becton Dickison, Madrid, Spanien

BD Microlance 3 27G ¾“ -Nr. 20 0,4 x 19 mm, Becton Dickison, Madrid, Spanien

BD Plastipak 1 mL, Becton Dickison, Madrid, Spanien

Deckgläser für die Mikroskopie 24 x 60 mm, Menzel Gläser, Braunschweig

Dünnschichtchromatographieplatten Kieselgel 60, 20 x 20 cm von Merck, Darmstadt

Feather Disposable Scalpel No. 23, sterile, Osaka, Japan

Injekt Solo Spritze 2 mL, B. Braun, Melsungen

Kryogefäße Cellstar 2 mL von Greiner Bio-One, Frickenhausen

Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film von

Mikrotiterplatten von Greiner Bio-One, Frickenhausen

Mikrovette® 500 µL, K3 EDTA, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Nitrozellulose-Membran 0,2 und 0,45 µm von BioRad, München

Prolene 6-0 Polypropylene 13 mm runde Nadel (C-1), 60 cm, Ethicon, Livingston, Schottland

Objekträger Superfrost® Plus 25 x 75 x 1,0 mm, Menzel Gläser, Braunschweig

Steriflip® Sterilfiltersystem von Merck Millipore, Schwalbach

Stripette® Zellkulturpipetten von Corning Incorporated, New York, USA

Whatman® Filterpapier 3mm von Whatman International Ltd., Maidstone, GB
 Zählkammer TC10™ System Counting Slites von BioRad, München
 Zellkulturflaschen von Greiner Bio-One, Frickenhausen
 Zellkulturplatten (24- und 96-Well-Platten) von Greiner Bio-One, Frickenhausen
 Zellkulturschalen (60, 100 und 150 mm Durchmesser) von Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.10. Operationsbesteck

Nadelhalter Olsen Hegar 12 cm 12002-12	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pinzette Aesculap Chir. 1000 mm/4“ 1x2 Zähne BD500R	Aesculap AG, Tuttlingen
Pinzette FST gerade st/st gezahnt 145 mm 11000-14	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pinzette gebogen 13 cm 11009-13	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Schere gebogen 85 mm 14091-09	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

2.1.11. Geräte

Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 200 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München
Filmentwickler, CP1000	AGFA Healthcare, Bonn
Herasafe Sterilbank	Heraeus, Hanau
Inkubator Heraeus BBD 6220	Heraeus, Hanau
Leica DFC310 FX Kamera	Leica Camera AG, Wetzlar
<i>Liquid Scintillation Analyzer</i> Tri Carb 2100 TR (α - und β -counter)	GMI, Ramsey, USA
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Micro-Dismembrator S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
<i>Microplate Reader Sunrise</i>	Tecan, Neustadt
Mikroplattenlesegerät SpectraMax M5	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
<i>Molecular Imager</i> Pharos FX Plus	Bio-Rad, München
NanoDrop® ND-1000 <i>Spectrophotometer</i>	PeqlabBiotechnologie, Erlangen
Pico 17 Zentrifuge	Heraeus, Hanau
<i>Thermocycler</i>	Bio-Rad, München

<i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf GmbH, Hamburg
Tri-Carb® 2100TR <i>Liquid Scintillation Analyzer</i>	PerkinElmer, Rodgau
Ultraschall-Desintegrator <i>Sonifier W-450</i>	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
7500 <i>Fast Real-Time PCR System</i>	Life Technologies, Darmstadt

2.1.12. Verwendete Tiere

Die unilaterale Ureterobstruktion wurde an C57BL/6J (Charles River), sowie SK2 *knockout*(SK2^{-/-})-Mäusen, die auf C57BL/6J Hintergrund zurückgekreuzt worden waren, durchgeführt. Des Weiteren wurde diese Methode an hSK2 tg Mäusen (EIIA-crex-JOS5a), sowie den entsprechenden Kontrollen hSK2 +stop (JOS 5a) angewendet.

2.1.12.1. Mäuse mit Deletion der SK2

Die SK2^{-/-}-Mäuse wurden bei Hofmann et al. 2008 bereits beschrieben und von GenOway© (Lyon Cedec, Frankreich) generiert. Dazu wurde an die Stelle der Exone 4 bis 7 ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen zur Selektion der Zellen eingesetzt, um einen Inaktivierungsvektor herzustellen, der zu einer Inaktivierung der SK2 führt. Es folgte der Transfer des Inaktivierungsvektors in embryonale Stammzellen 129Ola. Nach Elektroporation in C57BL/6-Blastozysten wurden diese in scheinchwangere Leihmütter eingesetzt, wodurch eine chimäre *Founder*-Generation mit heterozygoter SK2-Deletion entsteht. In der zentralen Forschungseinrichtung Frankfurt wurden F0-Böcke mit C57BL/6-Weibchen verpaart, wobei in der F1-Generation nicht deletierte Wildtyp-Mäuse, sowie heterozygote SK2 *knockout*-Mäuse entstehen. Es wurde eine konsequente Bruder-Schwester-Verpaarung (Inzucht) vorgenommen, um einen einheitlich genetischen Hintergrund zu erhalten. Für die Versuche wurden homozygote SK2^{-/-}-Tiere und C57BL/6-Mäuse als Kontrolle verwendet.

2.1.12.2. Mäuse mit Überexpression der humanen SK2

Die Mäuse mit einer Überexpression der humanen SK2, sowie deren Kontrollen wurden von GenOway© (Lyon Cedec, Frankreich) generiert. Zur Generierung dieser transgenen Mauslinie mit einer konstitutiv aktiven humanen SK2 wurde ein *knock-in* in den X-Chromosom-verlinkten Hypoxanthin Phosphoribosyl-Transferase (Hprt) Locus vorgenommen. Diese transgene Expression steht unter der Kontrolle des ubiquitären CAG (*human cytomegalovirus enhancer and chicken beta-actin*) Promotor. Dieser Promotor wird inaktiviert durch eine geflochte Stopkassette, die von loxP Erkennungsstellen eingerahmt ist. Werden diese Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die ubiquitär eine Cre Rekombinase exprimieren, schneidet die Cre Rekombinase an der Erkennungsstelle loxP die DNA und verbindet diese anschließend wieder, so dass die Stopkassette vor dem Gen der humanen SK2 herausgeschnitten wird und

das Gen exprimiert (hSK2 tg). Als Kontrollen wurden Mäuse verwendet, die nicht mit Cre Rekombinase exprimierenden Mäusen gekreuzt wurden. Somit wird die Stopkassette vor dem Gen der humanen SK2 nicht herausgeschnitten und die humane SK2 folglich nicht exprimiert (hSK2 +stop) (Abb 9).

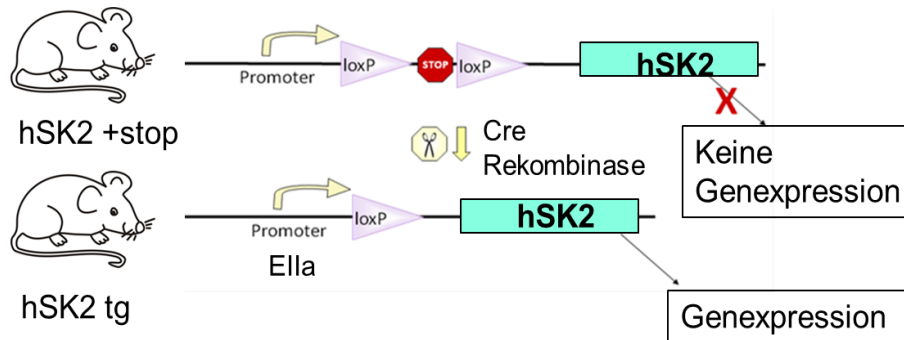


Abb. 9: Modell der Überexpression der humanen SK2

Die Expression der konstitutiv aktiven, humanen SK2 steht unter der Kontrolle des CAG (*human cytomegalovirus enhancer and chicken beta-actin*) Promotors. Durch die gefloxt Stopkassette findet keine Genexpression statt. Die Überexpression der humanen SK2 wird durch das Ella Cre loxP-System induziert. Mittels Kreuzung mit Cre-positiven Mäusen schneidet die Cre Rekombinase an der Erkennungstelle loxP die Stopkassette heraus und verbindet anschließend die DNA wieder. Durch das Ausschneiden der Stopkassette wird die humane SK2 exprimiert. Modifiziert nach http://mouseclique.jax.org/wp-content/uploads/2313.IMAGE1_.png-550x0.png

2.1.12.3. Tierhaltung

In der zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) der Universitätsklinik Frankfurt erfolgte die Haltung der oben genannten Mäuse nach §9 des Tierschutzgesetzes. Bei den Tierversuchen wurden die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes eingehalten und zuvor ein Antrag beim Regierungspräsidium in Darmstadt eingereicht und bewilligt.

Die Wildtyp-Mäuse, sowie die hSK2 +stop und hSK2 tg wurden jeweils ein bis zwei Wochen bis zum Versuch in offener Zucht gehalten. Dabei wurden durchsichtige Polycarbonkäfige des Eurostandard-Typs 3 (42,5 x 26,0 x 15,5 cm) verwendet und maximal fünf Mäuse auf Hobelspänen gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden in einem durch Zeitschaltuhr künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die einströmende Luft wurde durch einen Luftfilter gereinigt und eine Klimaautomatik sorgte für eine konstante Raumtemperatur von 22±2°C.

Die SK2^{-/-}-Mäuse wurden im SPF (*specific pathogen free*)-Bereich gezüchtet. Die Mäuse unterlagen dem gleichen Tag-Nacht-Rhythmus und den Klimabedingungen wie in der offenen Zucht. Hier wurden 4 Mäuse einem Polycarbonkäfig des Eurostandard-Typs 2 (36,5 x 20,7 x 14,0 cm) auf Hobelspänen gehalten. Für den Versuch wurden die SK2^{-/-}-Mäuse ebenfalls ein bis zwei Wochen im Voraus in die offene Zucht ausgeschleust.

2.1.13. Verwendete Zellen

In dieser Arbeit wurden primäre Maus-Mesangiumzellen verwendet. Diese stammen aus hSK2 +stop Mäusen (JOS 5a) und hSK2 tg Mäusen (EIIA-crex-JOS5a), die einen C57BL/6 Hintergrund haben (siehe Abschnitt 2.1.12). Aus diesem Grund wurden auch Zellen aus C57BL/6 Mäusen (Charles River) als Kontrolle verwendet.

Des Weiteren wurde eine humane, proximale Tubulusepithelzelllinie (HK2-Zellen) von Prof. Dr. Liliana Schäfer (Pharmazentrum Frankfurt/ZAFES, Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main) kultiviert.

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Isolation von Maus-Glomerula für Maus-Mesangiumzellen

Die Maus wurde mit Isofluran betäubt und durch Genickbruch getötet. Um den Bauchraum zu eröffnen, wurde das Fell am Bauch mit einer Pinzette angehoben und aufgeschnitten. Die Niere wurde mit einer Pinzette gegriffen und mit einer Schere konnten das Fettgewebe und die Nierenarterie abgetrennt werden. Die Niere wurde in ein 50 mL Falcon mit 10 mL sterilem PBS überführt. Der Vorgang wurde mit der anderen Niere wiederholt. Die beiden Nieren wurden in eine Zellkulturschale (100 mm Durchmesser) in PBS gegeben. Mit Hilfe von Pinzetten konnte nun die Nierenkapsel entfernt werden. Die Niere wurde nun auf das oberste von drei Sieben gelegt. Die Siebe besaßen eine Maschenweite von 106 µm oben, 180 µm in der Mitte und 53 µm unten. Das unterste Sieb mit 53 µm Maschengröße wurde zuvor mit PBS benetzt, da durch die geringe Maschenweite sonst keine Flüssigkeit gelangen konnte. Mit sterilen Handschuhen und einem Skalpell wurde die Niere zunächst zerkleinert, bevor sie mit dem Daumen vorsichtig durch das Sieb gestrichen wurde. Um möglichst viele Glomerula zu gewinnen, wurde mit PBS nachgespült. Die Glomerula blieben auf dem untersten Sieb hängen, während die Blutzellen alle Siebe passierten und die glomerulären Kapseln und tubuläre Bruchstücke in den oberen beiden Sieben hängen blieben. Anschließend wurden die oberen beiden Siebe abgenommen und das unterste Sieb mit der vorherigen oberen Seite nach unten auf eine Zellkulturschale mit 150 mm Durchmesser gelegt. Die Glomerula konnten nun von dem Sieb in die Zellkulturschale gespült werden. Dazu wurde das Sieb mit PBS gespült. Das PBS mit den Glomerula wurde auf zwei 50 mL Flacons gleichmäßig aufgeteilt und bei 1000 Upm (Umdrehungen pro Minute) für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend konnte das PBS abgesaugt werden. Die Glomerula wurden mit jeweils 3 mL Wachstumsmedium für Maus-Mesangiumzellen abgespült, vereint und auf Zellkulturflaschen mit Wachstumsmedium aufgeteilt. Im Brutschrank wuchsen die Glomerula 3 Wochen, bevor sie für Versuche verwendet werden konnten. Innerhalb dieser Zeit wuchsen sequenziell zunächst die Epithelzellen aus den Glomerula heraus. Zu dem Zeitpunkt, in dem die

Epithelzellen abzusterben begannen, wuchsen die Mesangiumzellen aus den Glomerula heraus.

2.2.2. Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der primären Maus-Mesangiumzellen und der HK2-Zellen erfolgte im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit mit dem jeweils beschriebenen Wachstumsmedium. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

2.2.3. Subkultivierung von adhärent wachsenden Zellen

Für die Subkultivierung adhärenter Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche lösten. Diese Reaktion wurde mit Wachstumsmedium abgestoppt. Die Zellen wurden entsprechend verdünnt und in neuen Zellkulturflaschen weiter kultiviert.

2.2.4. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um die Zellen in Kryogefäßen zu konservieren, wurden die Zellen zunächst wie in 2.3.3 beschrieben mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach einer Zentrifugation bei 800 x g für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Einfrier-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryogefäße aliquotiert und für 24 Stunden in einem Einfrierbad bei -80°C eingefroren. Die Lagerung erfolgte anschließend in flüssigem Stickstoff. Bei Bedarf wurde die Zellsuspension aufgetaut und in eine Zellkulturflasche mit warmem Wachstumsmedium überführt. Am folgenden Tag wurde das Wachstumsmedium gewechselt und die Zellen kultiviert, wie unter 2.3.3 beschrieben.

2.2.5. Stimulation adhärent wachsender Zellen

Für die Extraktion von RNA, Protein und Lipid sowie den DNA-Fragmentierungs-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 90% in den Zellkulturflaschen kultiviert. Dann wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und in 60 mm Zellkulturschalen ausgelegt, bzw. in 96 Well-Platten für den DNA-Fragmentierungs-ELISA. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit dem jeweiligen Hungermedium inkubiert, bevor sie mit den jeweiligen Substanzen stimuliert wurden.

2.2.6. Zellzählung

Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde eine Probe der Suspension entnommen und 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung vermischt. Trypanblau färbte dabei tote Zellen an, wobei die lebenden Zellen nicht angefärbt werden. Die mit Trypanblau-Lösung gemischte Suspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde die Anzahl der lebenden Zellen in einem Quadranten bestimmt.

2.2.7. Transiente Transfektion von HK2 Zellen

Für die Transfektion der HK2 Zellen mit non-target siRNA und SK2 siRNA (*small interfering RNA*) wurde Lipofectamine® 2000 verwendet. Die Zellen wurden dafür in Zellkulturschalen (PS) mit 60 mm Durchmesser ausgesät und bis zu einer Dichte von 30% bis 50% wachsen gelassen. Für die Transfektion wurden je 60 mm Zellkulturschale 5µl Lipofectamine® 2000 in 250 µL OptiMem-Medium und 1 µL der non-target bzw. SK2 siRNA aus jeweils einem 100 µM Stock in 250 µL OptiMem-Medium für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die beiden Ansätze wurden dann zur Bildung der DNA-Liposomen-Komplexe vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die Zellen wurde in der Zwischenzeit 2 mL OptiMem gegeben und dann 500 µL des non-target bzw. SK2 Transfektionsansatzes zugesetzt. Nach 5 Stunden Inkubationszeit wurde zum Abstoppen der Transfektion das Medium abgenommen und das Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben. Bei Konfluenz der Zellen wurden diese für 16 Stunden mit Hungermedium inkubiert und anschließend mit entsprechenden Stimulanzen inkubiert.

2.3. Durchführung der unilateralen

Ureterobstruktion an der Maus

Für die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) wurden 8 bis 10 Wochen alte, männliche Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden zunächst gewogen und anschließend mit einer intraperitonealen Applikation von 50-200 mg/kg Ketamin und 5-10 mg/kg Xylazin anästhesiert. Außerdem erhielten sie eine Injektion mit 0,1 mg/kg Buprenorphin intraperitoneal zur Schmerzstillung 30 Minuten vor der Operation. Mit Hilfe eines elektrischen Rasierers wurde das Fell im Bereich der linken Niere entfernt. Der enthaarte Bereich wurde gründlich gereinigt und anschließend desinfiziert. Vor Beginn der Operation wurde mit den Zwischenzehenreflex sichergestellt, dass die Maus keine Schmerzen verspürt. Die Operation wurde auf einer sterilen Unterlage und mit sterilem Operationsbesteck durchgeführt. Für eine spätere Analyse des Plasmas wurde der Maus mit einer Glaskapillare retrobulbär Blut abgenommen. Die linke Niere der Maus wurde frei präpariert und nach doppelter Ligation wieder in ihre ursprüngliche Lage gebracht. Die Operationswunde wurde dabei so klein wie möglich gehalten. Nach

erfolgter Operation wurde die Operationswunde vernäht und desinfiziert. Der beschriebene Eingriff dauerte maximal zwanzig Minuten, wobei die Anästhesie noch weitere 30 Minuten anhielt. In dieser Zeit wurde durch eine Wärmematte mit 37°C sichergestellt, dass die Maus nicht auskühlt. In den ersten drei Tagen nach dem Eingriff erhielt die Maus zwei Mal täglich 0,1 mg/kg Buprenorphin intraperitoneal.

Der Versuch wurde sieben Tage nach dem Eingriff durch eine Überdosis Pentobarbital (150 mg/kg intraperitoneal) beendet. Die Maus wurde eröffnet und über die Lebervene wurde Blut für eine spätere Analyse des Plasmas abgenommen. Danach wurden die rechte, unligierte und die linke, ligierte Niere entnommen und der Länge nach halbiert. Die eine Hälfte wurde für histologische Analysen in 4% Paraformaldehyd/PBS eingelegt. Die andere Hälfte der Niere wurde in einem Eppendorf Gefäß in flüssigem Stickstoff gekühlt und anschließend für Lipid-, RNA- und Protein-Analysen bei -80°C eingefroren.

Die Hälfte der Niere wurde mit einem Dismembrator (B. Braun, Melsungen) aufgearbeitet. Dabei wurden zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlte Gefäße mit einer ebenfalls zuvor gekühlten Kugel und der Nierenhälfte bei 400 Hz für 10 Sekunden geschüttelt. Die so entstandene pulverisierte und homogenisierte halbe Niere wurde auf 3 Eppendorfgefäße aufgeteilt. Für die Lipidanalyse wurde das Leergewicht der Eppendorfgefäße bestimmt, um spätere Ergebnisse auf die Masse des Gewebes beziehen zu können. In das Gefäß für die Lipidanalyse wurde danach 1 mL reines Methanol gegeben. In die anderen beiden Eppendorfgefäße wurden 1 mL TRI® Reagenz für die folgende RNA-Isolation oder 400 µL Lysispuffer für die folgenden proteinbiochemischen Methoden gegeben. Die Proben für die proteinbiochemischen Proben wurden bei -20°C, die Proben für Lipid-Analyse und RNA-Isolation bei -80°C eingefroren.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. RNA-Isolation

Auf die stimulierten Zellen (siehe 2.2.5) wurde pro 1mL TRI® Reagenz 0,2 mL Chloroform gegeben und für 15 Sekunden geschüttelt. Anschließend wurden die Proben zur Phasenbildung 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt der Proben für 10 Minuten bei 13000 g und 4°C. Die RNA befand sich in der oberen, wässrigen Phase und entsprach etwa 60% des eingesetzten TRI® Reagenzes. Diese Phase wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde nun mit 0,5 mL Isopropanol pro 1 mL eingesetztes TRI® Reagenz präzipitiert. Dazu wurden die Proben mit dem Isopropanol gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt der Proben bei 13000 g und 4°C für 10 Minuten. Das Isopropanol wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1,5 mL 75% Ethanol gewaschen und bei 13000 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde

abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde dann in 50 µL DEPC-Wasser gelöst und bei 55°C für 10 Minuten inkubiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

2.4.2. Konzentration- und Reinheitsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte über die optische Dichte (OD). Dazu wurden die Proben mit einem NanoDrop™ ND-100 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Die Konzentration c lässt sich aus OD bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor V und dem spezifischen Multiplikationsfaktor F 40 für RNA wie folgt berechnen:

$$c [\text{ng}/\mu\text{L}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

Dabei zeigt das Verhältnis von OD_{260} und OD_{280} an, ob die Lösung mit Proteinen oder Phenol verunreinigt ist. Das optimale Verhältnis für reine RNA liegt bei 2,0.

2.4.3. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde das Enzym Reverse Transkriptase verwendet. Mit Hilfe dieses Enzymes wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden pro Probe 1,2 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit 1 µl Random Hexamer Primer (0,2 µg/ml) und DEPC-Wasser auf 12 µl gemischt und für 3-5 Sekunden in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die Mischung wurde für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dabei entstandene Kondensstropfen wurden herunter zentrifugiert. Die Mischung wurde auf Eis gestellt und 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RiboLock Ribonuclease Inhibitor (29U/µl) und 2 µl 10 mM dNTP Mix wurden zugefügt. Nach dem Mischen des Ansatzes wurde dieser erneut herunter zentrifugiert. Danach folgte ein Inkubationsschritt bei 25°C für 5 Minuten. 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase wurde zugefügt, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand. Die Mischung wurde zuerst bei 25°C für 10 Minuten und dann bei 42°C für 60 Minuten inkubiert. Das Abstoppen der PCR erfolgte durch Erhitzen bei 70°C für 10 Minuten. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt oder bei -20°C eingefroren.

2.4.4. Real-Time-PCR (Taqman®)

Zur Analyse der enthaltenen mRNA Menge wird mit der synthetisierten cDNA eine Real-Time-PCR durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Polymerasekettenreaktion, wobei die PCR-Produkte mittels einer fluoreszierenden Sonde pro Amplifikationszyklus quantifiziert werden. Dabei werden sowohl das entsprechend zu analysierende Gen sowie ein Referenzgen verwendet. Als Referenzgen wurde 18S verwendet, da dieses kein stark reguliertes Gen ist. Es wurde folgende Mischung pro Probe verwendet:

18S rRNA:	untersuchtes Gen:
1 µl cDNA	5 µl cDNA
0,3 µl genspezifische Sonde (FAM-Markiert) inklusive Primer	1 µl genspezifische Sonde (FAM-markiert) inklusive Primer
10 µl Low Rox Mix	10 µl Low Rox Mix
8,7 µl Wasser	4 µl Wasser

Die Proben wurden in einer Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und durchlaufen folgende Zyklen:

50°C 5 Sekunden

94°C 15 Minuten

94°C 15 Sekunden

60°C 60 Sekunden

94°C 15 Sekunden } 40 Zyklen

60°C 60 Sekunden }

Der Schwellenzyklus Ct wurde mit der Software 7500 Fast System SDS software version 1.4 berechnet. Die Analyse der relativen mRNA-Expression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ Methode bestimmt. Die jeweilige Expression des Gens wurde auf die Expression der 18S rRNA referenziert und anschließend in GraphPad Prism graphisch dargestellt.

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. Präparation von Zelllysaten

Die Zellen wurden, wie unter dem Abschnitt 2.2.5 beschrieben, kultiviert. Nach der Stimulation der Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 200 µL Lysispuffer pro 60 mm Zellkulturschale und einem Zellschaber abgelöst. Das Zelllysate wurde in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und die Zellen mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier W-450) aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13000 Upm bei 4°C für 10 Minuten wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinmenge, wie unter 2.5.2 beschrieben, bestimmt. Für die Lipid-Analyse (2.7) wurden die abgelösten Zellen bei 1300 Upm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Um das Pellet zu waschen, wurde dieses in 1 mL kaltem PBS resuspendiert und erneut bei 1300 Upm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Bis zur Analyse wurde das Zellepellet bei -80°C eingefroren.

2.5.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes wird nach der Bradford-Methode durchgeführt. Zum Abgleich der Proteinmenge wurde eine Standardreihe mit BSA nach folgendem Schema hergestellt:

Wasser	800 µl	797 µl	794 µl	791 µl	788 µl	776 µl
1 mg/ml BSA als Standard	0 µL	3 µL	6 µL	9 µL	12 µL	24 µL

Es wurden Lysatmengen zwischen 2 und 5 µL auf 800 µL mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Das Bradford Protein Assay Reagenz (Roti®-Quant) wurde 1:5 verdünnt. Von dem jeweiligen Ansatz wurden 100 µL in eine 96-Well-Platte pipettiert. Mit dem Mikroplatten-Lesegerät *Sunrise* (Tecan, Neustadt) erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm und mit Hilfe des Programmes Magellan3 (Tecan, Neustadt) konnte die Proteinmenge anhand der Absorption bestimmt werden.

2.5.3. Trichloressigsäure-Präzipitation von Proteinen aus Zellkulturüberständen

Der Überstand der Zellproben wurde von den Zellen abgenommen und zunächst abzentrifugiert (13000 Upm, 4°C, 10 Minuten) um Zellreste zu entfernen. Zur Fällung der Proteine wurde eine Trichloressigsäure-Lösung (70%) zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für weitere 30 Minuten bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 10 µL Tris/HCl (pH 8,5) und 90 µL 1x SDS gelöst. Durch eine Inkubation bei 95°C für 10 Minuten wurden die Proben denaturiert und mittels SDS-PAGE (2.5.5) analysiert.

2.5.4. Kernprotein-Extraktion

Um zu überprüfen, ob die überexprimierte humane SK2 im Kern oder im Zytosol lokalisiert ist, wurde mit den Maus-Mesangiumzellen eine Extraktion der Zytosol- und Kernproteine durchgeführt. Dazu wurde das *Nuclear Extraction Kit* von Abcam verwendet. Die Zellen wurden in 100 mm Zellkulturschalen ausgelegt (siehe 2.2.5) und bei Konfluenz zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und es wurden die Zellen von jeweils zwei PS 100 miteinander vereint. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen für 5 Minuten bei 1000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde entsprechend seiner Zellzahl in 100 µL *Pre-Extraction Buffer* pro 1 Mio Zellen resuspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Durchmischen der Suspension für 10 Sekunden folgte ein

Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 12000 Upm. Im Überstand befand sich nun der zytoplasmatische Extrakt, der in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt wurde. Für das Kernpellet wurde ein *Extraction Buffer* vorbereitet. Es wurde DTT-Lösung sowie Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) in einer Konzentration von 1:1000 zugegeben. In diesem Puffer wurde das Pellet in einem Verhältnis von 10 µL pro 1 Mio Zellen gelöst. Dazu wurde der Kernextrakt für 15 Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle 3 Minuten die Suspension durchgemischt wurde. Um eine besser Ausbeute zu erreichen, wurden die Kernextrakte mit einem Ultraschallstab (siehe 2.5.1) aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 14000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Kernproteinen wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Wie unter 2.5.2 wurde der Proteingehalt der Zytosol- und Kernextrakte bestimmt. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE (2.5.5) und Liquid-Chromatographie mit anschließender Tandemmassenspektrometrie (2.7).

2.5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine aus den Lysaten wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dazu wurden zwischen 20 und 50 µg Protein mit 4x SDS versetzt und mit Lysispuffer entsprechend auf 50 µL aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde nun bei 95°C für 10 Minuten aufgekocht um die Proteine zu denaturieren. Die SDS-Gele befanden sich dabei in einer Kammer, die mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt war. Die Proben, sowie ein Molekulargewichtsmarker, wurden nun in die Taschen des Sammelgels geladen. Die Proben durchliefen das Sammelgel (Tab. 7) bei einer Spannung von 70 V. Sobald die Proben das Trenngel (Tab. 8) erreichten, wurde die Spannung auf 110 V erhöht, um die Proben aufzutrennen.

Tab. 8: Zusammensetzung des Sammelgels:

Sammel- gel für 2 Gele	SDS- PAGE- Sammel- gelpuffer	Polyacrylamid 30% Bisacrylamid 0,8%	H ₂ O	SDS 10%	Ammonium- persulfat (APS) 10%	Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)
	2,5 mL	1,3 mL	6 mL	100 µL	60 µL	20 µL

Tab. 9: Zusammensetzung der Trenngele:

Trenngel für 2 Gele	SDS-PAGE-Trenngelpuffer	Polyacrylamid 30% Bisacrylamid 0,8%	H ₂ O	SDS 10%	Ammoniumpersulfat (APS) 10%	Tetramethylethyldiamin (TEMED)
15%	5 mL	10 mL	4,6 mL	200 µL	200 µL	10 µL
10%	5 mL	8 mL	6,7 mL	200 µL	200 µL	10 µL
8%	5 mL	6,7 mL	8 mL	200 µL	200 µL	10 µL
6%	5 mL	4,1 mL	10,3 mL	200 µL	200 µL	10 µL

2.5.6. Western Blot Analyse

Mit Hilfe dieser Methode werden die zuvor nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen (2.5.6.1) und können anschließend mittels einer immunochemischen Detektion identifiziert und quantifiziert werden (2.5.6.2).

2.5.6.1. Elektrotransfer

Mittels der *Semi Dry* Methode nach Kyhse-Andersen (1984) erfolgte der Proteintransfer durch ein parallel zum Polyacrylamid-Gel angeordnetes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose-Membran. Dafür wurde eine *Semi Dry* Blotapparatur (TransBlot SD, BioRad) verwendet. Für den Blot wurden 3 Whatman-Papiere und eine Nitrozellulose-Membran auf die Größe des Polyacrylamid-Gels zugeschnitten und in den Transferpuffer für Western Blot eingelegt. Auf ein Whatman-Papier wurde zunächst die Membran positioniert, anschließend das Polyacrylamid-Gel und in oberster Schicht 2 Whatman-Papiere. Dabei wurden Luftblasen aus dem Blot-Aufbau entfernt. Für den Transfer wurde eine Spannung von 12 V für 75 Minuten angelegt.

Als alternative Methode zum *Semi Dry* als Elektrotransfer für kleine Proteine unter 50 kDa wurde das *Wet Blot* Verfahren verwendet. Dazu wurden die Elektrodenschwämme, das Whatman Papier und die Nitrozellulose-Membran in den Transferpuffer für Western Blot eingelegt und mit dem Gel zusammengebaut. Die Reihenfolge dabei ist: Anode, Elektrodenschwamm, 2 Whatman Papiere, Nitrozellulose-Membran, Polyacrylamid-Gel, 2 Whatman Papiere, Kathode. Dieser Aufbau wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Transfer-Kammer (Mini Transblot® Electrophoretic Transfer Cell) überführt. Der Proteintransfer erfolgte bei 70 V für 75 Minuten auf Eis.

Anschließend wurde der Erfolg des Transfers mittels einer Ponceau S-Lösung überprüft. Durch einen Waschschrift mit PBST wurde das Ponceau S von der Membran gewaschen und die Proteine immunochemisch nachgewiesen.

2.5.6.2. Immunochemischer Nachweis von Proteinen

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit einer 5% Milchpulverlösung blockiert und für eine Stunde inkubiert. Der Erst-Antikörper wurde in Blockierungspuffer angesetzt und über Nacht bei 4°C bei leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurde die Membran drei Mal für jeweils 15 Minuten mit PBST gewaschen. In einer 0,5% Milchpulverlösung wurde der Zweit-Antikörper angesetzt und unter leichtem Schütteln für eine Stunde auf der Membran inkubiert. Der Zweitantikörper ist mit Meerrettichperoxidase gekoppelt, wodurch eine Detektion mittels Substrat möglich wird. Danach erfolgten 3 weitere Waschschriffe für jeweils 10 Minuten mit PBST. Zur Detektion der Immunreaktion wurde ein Chemilumineszenz-Substrat auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde die Lichtemission durch Auflegen eines Autoradiographiefilms und Entwickeln des Films in der Entwicklermaschine CP 1000 (AGFA Healthcare, Bonn) sichtbar gemacht. Auf dem Film wurden so Proteinbanden sichtbar, die mit dem Programm ImageJ quantifiziert werden konnten. Zum Entfernen des gebundenen Antikörpers und des Chemilumineszenz-Substrats wurde die Membran mit Wasser gewaschen und konnte mit dem nächsten Antikörper inkubiert werden.

2.6. Bestimmung zellulärer Parameter

2.6.1. Aktivitätsmessung der Sphingosinkinasen

Für die Aktivitätsmessung wurden 10 µg Proteinlysat (siehe 2.5.1 Präparation von Zelllysaten und 2.5.2 Bestimmung des Proteingehaltes) verwendet und auf 180 µL mit Sphingosin Kinase Puffer aufgefüllt und auf Eis gestellt. Der Mastermix enthielt Sphingosin als Substrat (10 µL pro Probe), 200 mM MgCl₂ (10 µL pro Probe) und γ[³²P]-ATP (0,2 mL pro Probe). Von diesem Mastermix wurden 20 µL zu jeder Probe gegeben, gemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen wurden 20 µL 1N HCl auf die Probe gegeben und auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 800 µL Chloroform/Methanol/HCl (Extraktionspuffer) wurden die Proben gemischt und dann kurz zentrifugiert. Bei Raumtemperatur erfolgte eine Zugabe von 240 µL Chloroform und 240 µL 2M KCl. Die Proben wurden erneut gemischt und bei 13000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert, wobei zwei Phasen entstanden. 50 µL der unteren Phase wurden auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen und in das Laufmittel gestellt. Die Auftrennung der Lipide erfolgte durch den Lauf über die Dünnschichtchromatographieplatte. Anschließend wurde die Platte in Folie verpackt und über Nacht in eine Kassette mit einem

Film gelegt. Dieser Film konnte mit dem *Molecular Imager* Pharos FX Plus (Bio-Rad, München) und dem Programm Quantity One ausgelesen und ausgewertet werden.

2.6.2. Nachweis der Proliferation mittels [³H]-Thymidin-Einbau

In eine 24 Well-Platte wurden 20.000 Zellen pro Well in 0,5 mL Wachstumsmedium ausgesät. Durch die Zugabe 0,2 µCi/mL [³H]-Methyl-Thymidin konnte die Proliferation analysiert werden. Die Zellernte erfolgte jeweils nach 5, 24, 48 und 72 Stunden. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation der Zellen für 30 Minuten mit 0,5 mL 5% Trichloressigsäure bei 4°C. Dann wurden sie zwei Mal mit 5% Trichloressigsäure gewaschen, bevor sie mit 0,5 mL 0,5 M NaOH für 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Die NaOH-Lösung wurde in Scintillationsgefäße überführt und die Lösung wird mit 0,25 mL Essigsäure neutralisiert. Die Kontrolle bildeten 0,5 mL NaOH und 0,25 mL Essigsäure. In alle Gefäße wurden 3 mL Scintillationsflüssigkeit gegeben. Nach dem Durchmischen der Proben konnte die aufgenommene Menge an [³H]-Methyl-Thymidin in die DNA der Zellen mittels β-Strahlenmessgerät Tri Carb 2100 TR (GMI, Ramsey, USA) bestimmt werden.

2.6.3. DNA-Fragmentierungs-ELISA

Zur optischen Analyse von DNA-Fragmentierung wurde das *Cell Death Detection PLUS-Kit* von Roche verwendet. Der programmierte Zelltod wird auch Apoptose genannt und ist gekennzeichnet durch Blasenbildung der Membran (Zeiose), Kondensation des Zytoplasmas und die Aktivierung von endogenen Nukleasen. Diese werden im ELISA zu Nutze gemacht. Die endogenen Nukleasen spalten den DNA-Doppelstrang und formen auf diese Weise Histon-gebundene Mono- und Oligonukleosomen mit einer Größe von etwa 180 bp. Mit Hilfe von Anti-Histon- und Anti-DNA-Antikörpern können diese detektiert werden noch bevor die Zellmembran zusammenbricht. Dazu wurden 2000 Zellen der Maus-Mesangiumzellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 16 Stunden mit Hungermedium inkubiert. Dieses wurde ebenfalls für die Kontrollen verwendet. Zur Stimulation der Apoptose wurden die Zellen mit 10 nM Staurosporin, TNFα/CHX (TNFα 2nM, CHX 10 µM) oder LPS/CHX (LPS 100 ng/mL, CHX 10 µM) für 6 Stunden inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden die Zellen für 10 Minuten bei 800 Upm zentrifugiert. Zum Aufbruch der Zellmembran wurden die Zellen mit 200 µL Lysispuffer für 30 Minuten inkubiert. Damit sich die Zelltrümmer absetzen wurde erneut bei 800 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Aus dem Überstand, der nun die Zytoplasma-Fraktion enthält, wurden 10 µL mit 10 µL *reaction buffer* verdünnt und mit 80 µL Immunoreagenz in die ELISA-Platte gegeben. Das Immunoreagenz enthielt Anti-Histon-Biotin-Antikörper, um an der mit Streptavidin-beschichteten ELISA-Platte

zu binden, und Anti-DNA-Peroxidasen, die am DNA-Anteil der Nukleosomen binden. Durch drei Waschschriffe wurde ungebundener Antikörper entfernt. Nach Zugabe des Substrats ABTS war ein Farbumschlag sichtbar, der mit der DNA-Fragmentierung korrelierte. Diese Reaktion wurde mit der *stop solution* abgestoppt und die Absorption wurde bei 405 nm mit einer Referenzwellenlänge von 490 nm mit dem Mikorplattenlesegerät SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, USA) gemessen. Als Blank wurde *reaction buffer* statt Zelllysat verwendet. Der Blank wurde von den gemessenen Rohwerten abgezogen.

2.7. Lipid-Analyse mittels LC-MS/MS

Die Analysen der Sphingolipide mit Hilfe von Liquid-Chromatographie und anschließender Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurden durch das Institut für Klinische Pharmakologie unter Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer.nat. Gerd Geißlinger aufgearbeitete, gemessen und ausgewertet. Das Nierengewebe wurde mittels einer Scheibenschwing-Mühle (Retsch, Haan) mit vier Zirconiumoxid-Kugeln für 2 Minuten bei 25 Hz aufgearbeitet und auf eine Konzentration von 0,05mg/µL gebracht. 20 µL Gewebesuspension, was 1 mg Gewebe entsprach, 10 µL Plasma, Kern- und Zytosol-Extrakte oder das Zellpellet wurden mit 150 µL Wasser und 150 µL Extraktionspuffer (30 mmol/L Citronensäure, und 40 mmol/L Dinatriumhydrogenphosphat) vermischt. Dazu wurden 20 µL interner Standard zugegeben, der Sphingosin-d7 und Sphinganin-d7 in einer Konzentration von 200 ng/mL in Methanol, sowie S1P-d7 mit einer Konzentration von 400ng/mL in Methanol enthielt. Für das Zellpellet und die Kern- und Zytosol-Extrakte wurde zusätzlich C16:0 Ceramid-d3 in einer Konzentration von 400ng/mL in Methanol verwendet. Die Mischung wurde mit 1000 µL Methanol/Chloroform/Salzsäure (15:83:2, V/V/V) extrahiert. Die untere, organische Phase wurde bei 45°C und unter Stickstoff verdampft und in 100 µL Tetrahydrofuran/Wasser (9:1 V/V) mit 0,2 mmol/L Ameisensäure und 10 mmol/L Ammoniumformiat rückgelöst. Die Menge der Sphingolipid-Metabolite wurde mittels Flüssigchromatographie gekoppelt an ein Tandem-Massenspektrometer bestimmt. Für die chromatographische Auftrennung wurden eine Agilent 1100 binäre Pumpe (Agilent Technologies, Waldbronn) und eine Luna C8 Säule (150 x 2mm ID, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße, Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet. Die Säulentemperatur betrug 35°C. Die mobile Phase für die Flüssigchromatographie bestand aus Wasser mit 0,2% Ameisensäure und 2 mmol/L Ammoniumformiat (mobile Phase A) und Acetonitril/Isopropanol/Aceton (50:30:20, V/V/V) mit 0,2% Ameisensäure (mobile Phase B). Für die Auftrennung wurde eine Flussrate von 0,3 mL/Minute verwendet. Die initiale Pufferkonzentration von 55% A und 45% B wurde für 0,7 Minuten gehalten und wurde innerhalb von 4 Minuten linear zu 0% A und 100% B geändert. Die Zusammensetzung wurde für 13,3 Minuten beibehalten. Anschließend wurde die Zusammensetzung innerhalb von 1 Minute auf 75% A und 25% B geändert und für 2 Minuten beibehalten. Die totale Laufzeit

betrug 21 Minuten und das Injektionsvolumen war 15 µL. Um die Ionisierung zu verbessern wurde Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure und eine isokratische Pumpe mit einer Flussrate von 0,15 mL/Minute verwendet. Nach jeder Probe wurde die Säule für 12 Minuten mit Probenpuffer gewaschen. Die Tandemmassenspektrometrie-Analyse wurde mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer API4000 (Sciex, Darmstadt) und einer Turbo V Ionenquelle mit einem positiven Elektrospray-Ionisierungsmodus durchgeführt. Die Massenspektrometer-Parameter wurden wie folgt eingestellt: 5500 V Ionenspray-Spannung, Quelltemperatur 500°C, 30 psi Vorhanggas, 12 psi Kollisionsgas, 40 psi Verneblungsgas, 60 psi Heizgas. Die Analyse wurde mittels *multiple reaction monitoring* (MRM)-Modus mit einer Verweilzeit von 20 Millisekunden durchgeführt. Die Daten wurden mit Analyst Software Version 1.6 und MultiQuant Software Version 3.0 (beides von Sciex) anhand des Isotop-spezifischen, internen Standards analysiert. Die Abweichungen vom internen Standard betragen nicht mehr als 15% außer für das untere Limit der Quantifizierung, wo eine Abweichung von 20% akzeptiert wurde.

2.8. Histologische Immunochemie

2.8.1. Vorbereitung der Paraffinblöcke

Die halben Nieren aus dem Tierexperiment 2.3 wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Die fixierten Nieren wurden zur Paraffinisierung in Plastikkassetten überführt. In einer automatischen Gewebeeinfiltrationsmaschine werden die Nieren nacheinander mit 50%, 75%, 90%, 96% und 100% Ethanol, Isopropanol und Xylol dehydriert und zum Schluss mit Paraffin infiltriert. Die getrockneten Nieren wurde in Einbettformen aus Edelstahl platziert, in flüssigem Paraffin eingebettet und mit einem Plastikdeckel abgedeckt. Dabei wurden die Nieren so platziert, dass die Schnittfläche längs in der Einbettform unten liegt. Zur Aushärtung wurden die Blöcke auf eine Kühlplatte gelegt. Anschließend konnten 3 µm dünne Schnitte angefertigt werden. Diese wurden auf Objektträgern bei 37°C im Trockenschrank über Nacht getrocknet. Die angefertigten Schnitte konnten nun mit verschiedenen Antikörpern oder Methoden angefärbt werden.

2.8.2. SK2 Färbung

Die Färbung der SK2 erfolgte auf Schnitten einer gesunden, menschlichen Niere (die Studie wurde vom Ethik Komitee der medizinischen Fakultät der Universität Münster genehmigt). Die Schnitte wurden durch eine Ethanol-Reihe rehydriert:

10 Minuten Xylol

10 Minuten Xylol

5 Minuten 100% Ethanol

5 Minuten 90% Ethanol

5 Minuten 70% Ethanol

5 Minuten 50% Ethanol

5 Minuten destilliertes Wasser

Darauf folgte ein Citratpuffer-Verdau mit dem Darko-Citratpuffer. Dieser wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und die Schnitte wurden darin für 10 Minuten bei 800 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Die Schnitte im Puffer kühlten bis auf Raumtemperatur ab und wurden dann zwei Mal mit TBS gewaschen. Der 1. Antikörper gegen SK2 wurde in *Dako Antibody Diluent* 1:200 verdünnt. Dabei wurden 100 µL auf jeden Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zwei Mal mit TBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde mit dem 2. Antikörper Ziege Anti-Kaninchen und Ziegen Serum (1:30:10) bei 37°C. Nach erneutem Waschen mit TBS wurden die Schnitte mit APAAP (Kaninchen) 1:5 für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit dem Alkaline Phosphatase Permanent AP Red Kit wurde die Färbung der SK2 sichtbar gemacht. Die Färbung wurde gestoppt, indem die Schnitte in Leitungswasser gestellt wurden. Als Abgleich wurden die Kerne in den Schnitten mit Hematoxylin gefärbt. Das Hematoxylin wurde mit Wasser abgewaschen bis das Wasser klar war. Nun wurde die Deparaffinisierung rückwärts durchlaufen, bevor ein Deckglas mit Entellan auf den Schnitten fixiert wurde. Die Schnitte wurden mit dem Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss) in x100 Vergrößerung analysiert. Die Aufnahmen der Bilder erfolgte mit der Kamera Leica DFC310 FX (Leica Camera AG).

2.8.3. Sirius Red Färbung

Mit dieser Färbung werden Bindegewebsfasern (Kollagene) angefärbt. Die dickeren Typ I Fasern erscheinen in polarisiertem Licht gelb-orange, während die dünneren Typ III Fasern eher grün hervorkommen. Dazu wurden die Schnitte mittels einer Ethanol-Reihe rehydriert:

10 Minuten Xylol

10 Minuten Xylol

5 Minuten 100% Ethanol

5 Minuten 90% Ethanol

5 Minuten 70% Ethanol

5 Minuten 50% Ethanol

5 Minuten destilliertes Wasser

Anschließend wurden die Kerne mit Hematoxylin angefärbt. Das Hematoxylin wurde danach mit Wasser abgewaschen bis das Wasser wieder klar war. Das Wasser wurde von den Schnitten abgezogen und die Objektträger in einem Kasten platziert. Die Schnitte platziert man dabei auf einer Erhöhung und der Boden des Kastens wird mit Wasser bedeckt, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. Anschließend wurden 100 µL Pico-Sirius Red Lösung für eine halbe Stunde auf die Wildtyp- und SK2^{-/-} -Nierenschnitten und für eine Stunde auf die

hSK2 +stop und hSK2 tg Nierenschnitten gegeben. Das Sirius Red F3B („Direct Red“) wurde in einer Konzentration von 0,5 g in 500 mL einer gesättigten wässrigen Lösung von Pikrinsäure gelöst. Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte zwei Mal in „saurem Wasser“ gewaschen. Das „saure Wasser“ bestand aus eine 0,2% Eisessig-Lösung. Das Wasser wurde anschließend von den Schnitten entfernt und diese wurden drei Mal für 5 Minuten mit 100% Ethanol gewaschen. Nach zweimaliger Inkubation für 10 Minuten in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan und einem Deckglas versehen. Mit dem Lichtmikroskop Axiovert 200 (Zeiss) in x100 Vergrößerung unter Verwendung eines Polarisationsfilters wurden Aufnahmen (Kamera Leica DFC310 FX, Leica Camera AG) der Schnitte gemacht. Die Quantifizierung erfolgte mittels des Programmes ImageJ.

2.8.4. AZAN-Färbung

Mit der Azan-Färbung, auch Trichrom-Färbung genannt, wird Bindegewebe angefärbt. Das Zytoplasma erhält dabei eine Rotfärbung, während Kollagenfasern eine blaue Färbung aufweisen. Die Schnitte wurden für die Färbung zuerst deparaffinisiert:

10 Minuten Xylol

10 Minuten Xylol

5 Minuten 100% Ethanol

5 Minuten 90% Ethanol

5 Minuten 70% Ethanol

5 Minuten 50% Ethanol

5 Minuten destilliertes Wasser

Anschließend wurden die Schnitte für 6 bis 8 Minuten in Azokarmin mit Essigsäure als Oxidationsmittel inkubiert. Nach dem Abspülen mit 1% Essigsäure wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser abgespült. Es folgte eine Inkubation von 20 Minuten mit 5 % Phosphorwolframsäure. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit destilliertem Wasser abgewaschen. Die Schnitte wurden für 3 bis 4 Minuten mit Anilinblau und Orange G in Essigsäure gefärbt, bevor sie mit destilliertem Wasser gewaschen wurden. Nach einem Waschschrift mit 96% Ethanol, folgte 100% Ethanol und zwei Inkubationszeiten von jeweils 5 Minuten in Xylol. Mit Hilfe von Entellan wurde die Färbung mit einem Deckglas fixiert. Die Schnitte wurden mit dem Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss) in x100 Vergrößerung betrachtet. Die Aufnahmen der Bilder erfolgte mit der Kamera Leica DFC310 FX (Leica Camera AG).

2.8.5. PAS-Reaktion

Mit der *periodic acid-Schiff reaction* (PAS)-Reaktion werden Bindegewebsfasern, Membranen und Zellwände durch eine magenta-rote bis pinke Färbung sichtbar gemacht. Die Nierenschnitte werden dazu mittels einer Ethanolreihe deparaffinisiert:

10 Minuten Xylol

10 Minuten Xylol

5 Minuten 100% Ethanol

5 Minuten 90% Ethanol

5 Minuten 70% Ethanol

5 Minuten 50% Ethanol

5 Minuten destilliertes Wasser

Die Schnitte wurden für 5 Minuten in 0,8% Perjodsäure inkubiert, bevor sie mit destilliertem Wasser gewaschen wurden. Anschließend wurde Schiff'sches Reagenz für 20 Minuten auf die Schnitte gegeben. Dieses wurde unter laufendem Leitungswasser abgespült. Die Kerne wurden nun mit Hematoxylin angefärbt. Das Hematoxylin wurde mit Leitungswasser abgewaschen und die Schnitte für 3 Minuten in destilliertes Wasser gegeben. Die Ethanolreihe vom Anfang wurde in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit Entellan fixiert. Die gefärbten Schnitte wurden unter einem Mikroskop (Axiovert 200 Vergrößerung x100, Zeiss) betrachtet und repräsentative Aufnahmen (Leica DFC310 FX Kamera, Leica Camera AG) der jeweiligen Nierenschnitte angefertigt. Mittels Verblindung wurde der tubuläre Schaden von zwei Beobachtern evaluiert. Dazu wurde der tubuläre Schaden in eine Skala von 1 bis 4 unterteilt: 0, normal; 1 \leq 25% des Cortex, 2 > 25% bis 50% des Cortex, 3 \geq 50% bis < 75% des Cortex und 4 \geq 75% des Cortex. Die Analyse erfolgte mit dem Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss) in x100 Vergrößerung. Die Bilder wurden mit der Kamera Leica DFC310 FX (Leica Camera AG) aufgenommen.

2.8.6. α -SMA-Färbung

α -SMA ist ein Marker für Myofibroblasten und wird bei Fibrose verstärkt exprimiert. Die Schnitte wurden mit Hilfe einer Ethanol-Reihe rehydriert:

10 Minuten Xylol

10 Minuten Xylol

5 Minuten 100% Ethanol

5 Minuten 90% Ethanol

5 Minuten 70% Ethanol

5 Minuten 50% Ethanol

5 Minuten destilliertes Wasser

Anschließend folgte ein Citratpuffer-Verdau mit dem Darko-Citratpuffer. Dieser wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und die Schnitte wurden darin für 10 Minuten bei 800 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Die Schnitte im Puffer kühlten bis auf Raumtemperatur ab und wurden dann zwei Mal mit TBS gewaschen. In einem nächsten Schritt wurden mit einer 3% Wasserstoffperoxid-Lösung die endogenen Phosphatasen blockiert. Nach einem Waschschrift mit TBS folgte eine Inkubation mit Avidin für 10 Minuten gefolgt von einer Inkubation mit Biotin für 10 Minuten. Sowohl zwischen den Inkubationen als auch danach folgte ein Waschschrift mit TBS. Da der Zweitantikörper zu α -SMA ein anti-Maus-Antikörper ist, musste das Mausgewebe der Schnitte zunächst blockiert werden. Dazu wurde ein M.O.M. Kit verwendet und die Schnitte über Nacht bei 4°C mit Mouse Ig Blocking Reagent aus diesem Kit blockiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zwei Mal mit TBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit *M.O.M. Diluent* inkubiert, das eine *Protein Concentrate stock solution* enthielt. Diese Lösung wurde von den Schnitten abgezogen und der Erstantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 in *M.O.M. Diluent* auf die Schnitte gegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS wurde der biotinylierte Anti-Mouse IgG Zweitantikörper 1:1000 in *M.O.M. Diluent* auf die Schnitte gegeben und 5 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift mit TBS wurden die Schnitte für 30 Minuten mit ABC (*Avidin/Biotinylated Enzyme Complex*) Reagenz inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit TBS wurde das DAB (3, 3-Diaminobenzidin) Substrat zugegeben. Die Peroxidase aus dem ABC Reagenz oxidiert das DAB Substrat, wodurch ein brauner Farbstoff entsteht. Dieser dient zur Detektion der Proteinexpression, in diesem Fall α -SMA. Diese Reaktion wurde in Wasser abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit TBS wurden die Zellkerne mit Hematoxilin angefärbt und der überflüssige Farbstoff anschließend mit Wasser abgewaschen. Nun wurde die Ethanol-Reihe in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen und die Färbung der Schnitte abschließend mit Entellan und einem Deckglas fixiert. Die Schnitte wurden mit dem Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss) in x100 Vergrößerung analysiert. Die Aufnahmen der Bilder erfolgte mit der Kamera Leica DFC310 FX (Leica Camera AG).

2.8.7. Makrophagen-Infiltration

Da Makrophagen einen speziellen Marker F4/80 aufweisen, lassen sie sich immunochemisch auf den histologischen Schnitten der Nieren nachweisen. Zur Deparaffinisierung durchliefen die Nierenschnitte folgende Ethanolreihe:

10 Minuten Xylol

10 Minuten Xylol

5 Minuten 100% Ethanol

5 Minuten 90% Ethanol

5 Minuten 70% Ethanol

5 Minuten 50% Ethanol

5 Minuten destilliertes Wasser

Es folgte ein Citratpuffer-Verdau mit dem Darko-Citratpuffer. Dieser wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und die Schnitte wurden darin für 10 Minuten bei 800 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Die Schnitte im Puffer kühlten bis auf Raumtemperatur ab und wurden dann zwei Mal mit TBS gewaschen. Der 1. Antikörper gegen F4/80 wurde in Dako *Antibody Diluent* 1:200 verdünnt. Dabei wurden 100 µL auf jeden Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zwei Mal mit TBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten mit dem 2. Antikörper *rat anti mouse* bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zwei Mal mit TBS gewaschen und anschließend 100 µL des Peroxidase Substrats auf die Schnitte gegeben. Für das Peroxidase-Substrat wurden in 2,5 mL MiliQ-Wasser 1 Tropfen Puffer, 2 Tropfen DAB und 1 Tropfen Peroxide Solution gegeben. Die Färbung wurde gestoppt, in dem die Schnitte in Leitungswasser gestellt wurden. Als Abgleich wurden die Kerne in den Schnitten mit Hematoxylin gefärbt. Das Hematoxylin wurde mit Wasser abgewaschen bis das Wasser klar war. Nun wurde die Deparaffinisierung rückwärts durchlaufen, bevor ein Deckglas mit Entellan auf den Schnitten fixiert wurde. Die Analyse der Schnitte erfolgte mit dem Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss) in x100 Vergrößerung. Die Bilder wurden mit der Kamera Leica DFC310 FX (Leica Camera AG) aufgenommen. Zur Evaluation der Makrophagen-Infiltration wurden die F4/80-positiven Areale mit dem Fuji Plugin der ImageJ Software quantifiziert.

3. Ergebnisse

Die im nachfolgenden Teil gezeigten Ergebnisse wurden weitestgehend publiziert in Schwalm et al. 2017 und Beyer et al. 2018.

3.1. Unilaterale Ureterobstruktion als Modell für eine tubulointerstitielle Fibrose

3.1.1. Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäuse

3.1.1.1. Charakterisierung der SK2 im Modell der unilateralen Ureterobstruktion

Nach Durchführung der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) an Wildtyp (WT)- und SK2^{-/-}-Mäusen wie unter 2.3 beschrieben, wurden die Nierenlysate aufgearbeitet und nach 2.5.2 der Proteingehalt bestimmt. Von den Nierenlysaten wurden 50 µg Protein für SDS-PAGE (2.5.5) und anschließender Western Blot Analyse (2.5.6) eingesetzt. Der SK2-Aktivitätsassay wurde mit 10 µg Protein nach 2.6.1 durchgeführt und die Aufarbeitung der RNA-Proben der Nieren erfolgte wie unter 2.4 beschrieben.

Zunächst wurde mittels Western Blot Analyse sichergestellt, dass in den SK2^{-/-}-Mäusen keine murine SK2 exprimiert wird. Dies konnte in Abb. 10 bestätigt werden, da auf spezifischer Höhe der SK2 bei 68 kDa in den Lysaten der SK2^{-/-}-Mäusen keine Bande zu sehen ist.

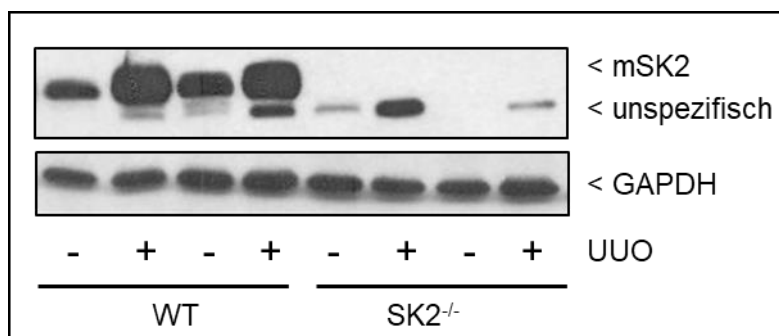


Abb. 10: Expression der SK2 nach UUO

Zur Analyse der Deletion der SK2 wurde ein Western Blot (2.6.6) mit 50 µg Protein durchgeführt. SK2 hat eine Größe von 68 kDa. Unterhalb dieser Bande verläuft noch eine unspezifische Proteinbande. GAPDH (36 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet.

In Abb. 11 A ist die Quantifizierung der Expression der SK2 in Wildtyp-Mäusen dargestellt. Als Kontrolle wurde dabei immer die rechte Niere verwendet, während die linke, ligierte Niere mit UUO bezeichnet wird. Dabei war sowohl im Western Blot in Abb. 10 als auch in der Quantifizierung in Abb. 11 eine signifikant erhöhte Expression der SK2 in den UUO-Nieren zu beobachten. Um sicher zu gehen, dass nicht nur die Expression erhöht, sondern die SK2 in den UUO-Nieren auch aktiv war, wurde ein SK2-Aktivitätsassay durchgeführt, der zeigt, dass die Aktivität der SK2 in den UUO-Nieren ebenfalls signifikant erhöht war im Vergleich zu den

Kontroll-Nieren. Im Unterschied dazu war keine Veränderung der SK2-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 11 C) erkennbar.

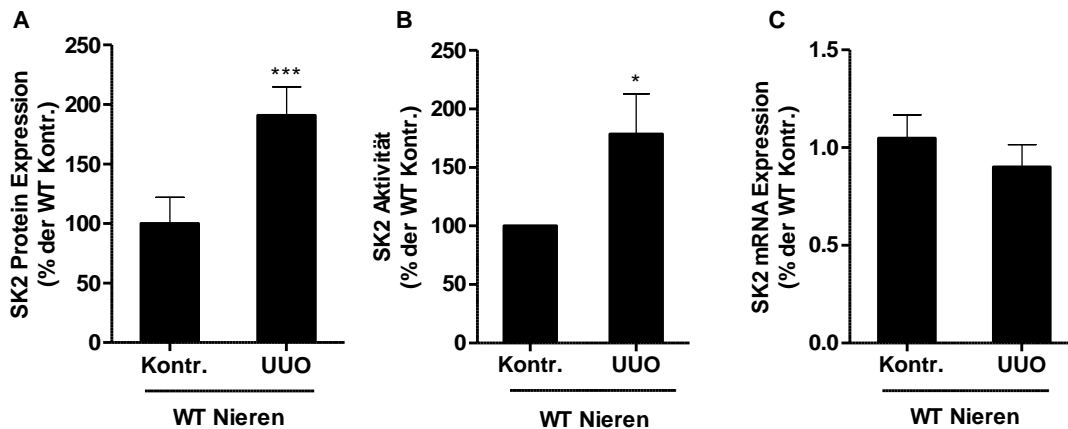


Abb. 11: Expression und Aktivität der SK2 in Wildtyp-Mäusen nach UUO

In den Wildtyp (WT)-Mäusen wurde die SK2 hinsichtlich Protein-Expression (A), Aktivität (B) und mRNA-Expression (C) untersucht. Die Quantifizierung der Western Blot Analyse aus Abb. 10 ist in (A) dargestellt. Für den Aktivitätsassay der SK2 (B) wurden 10 µg Protein der Nierenlysate eingesetzt. Für die Messung der relativen SK2 mRNA-Expression (C) wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt wie unter 2.5.4 beschrieben. Die Daten wurden jeweils als Mittelwert in % der unbehandelten Wildtypnieren dargestellt (n=7-8). *p<0,05, ***p<0,001 mittels T-Test.

Weiterhin sollte die Lokalisation der SK2 in der Niere bestimmt werden. Dazu wurde ein histologischer Schnitt einer humanen Niere mit Antikörper gegen die SK2 angefärbt. Wie in Abb. 12 durch die braune Färbung zu sehen ist, ist die SK2 in den distalen Tubuli lokalisiert. Für die Negativkontrolle wurde der Schnitt wie unter (2.8.2) beschrieben behandelt, allerdings ohne Inkubation des Erstantikörpers.

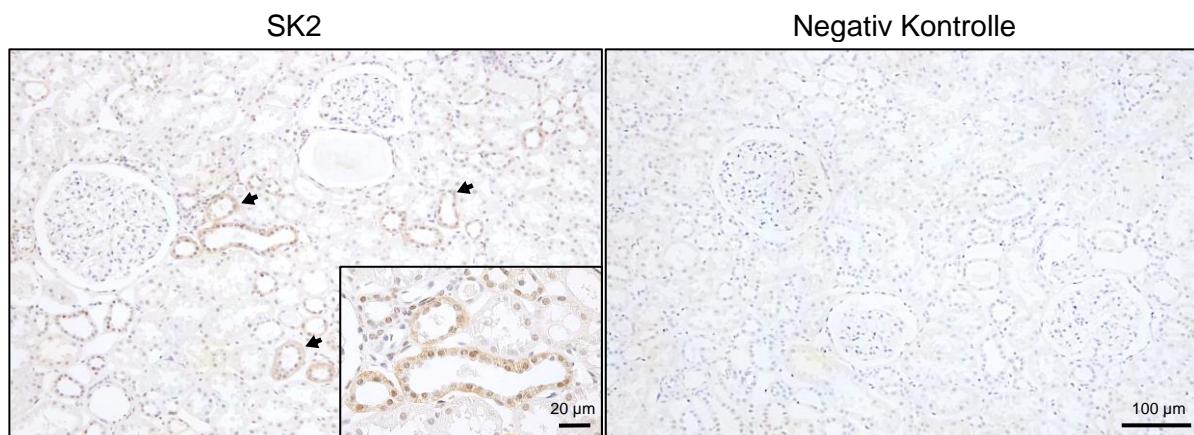


Abb. 12: Lokalisation der SK2 in humaner Niere

Die Schnitte wurden wie unter 2.8.2 beschrieben angefärbt um die Lokalisation der SK2 in der Niere zu bestimmen. Dazu wurde bei der Negativkontrolle nicht mit dem Erstantikörper inkubiert. Die Skala der Schnitte entspricht 100 µm und 20 µm für den vergrößerten Ausschnitt.

3.1.1.2. Fibrosemarker im Modell der unilateralen Ureterobstruktion

Da die unilaterale Ureterobstruktion ein Modell für tubuläre Nierenfibrose darstellt, sollten in diesem Abschnitt verschiedene Fibrosemarker untersucht werden. Zuerst lag das Augenmerk auf CTGF und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) als sehr wichtige Marker fibrotischer Erkrankungen. In Abb. 13 ist die CTGF- und PAI-1-Expression auf mRNA- (Abb. 13 A) und Protein-Ebene (Abb. 13 B) abgebildet. Während bei den WT-Mäusen eine signifikant drei- bis vierfache Erhöhung der CTGF-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene zu beobachten war, stieg die CTGF-Expression in den SK2^{-/-}-Mäusen nur etwa auf das Doppelte an. PAI-1 stieg auf RNA-Ebene in den WT-UUO-Nieren sogar noch stärker auf das 20-fache an, während es in den SK2^{-/-}-UUO-Nieren dazu signifikant verringert war. Auf Protein-Ebene stieg die PAI-1-Expression in den Wildtyp-Mäusen durch das UUO-Modell um das Siebenfache an, während der Anstieg in den SK2^{-/-}-Mäusen bei einem dreifachen Anstieg signifikant verringert war.

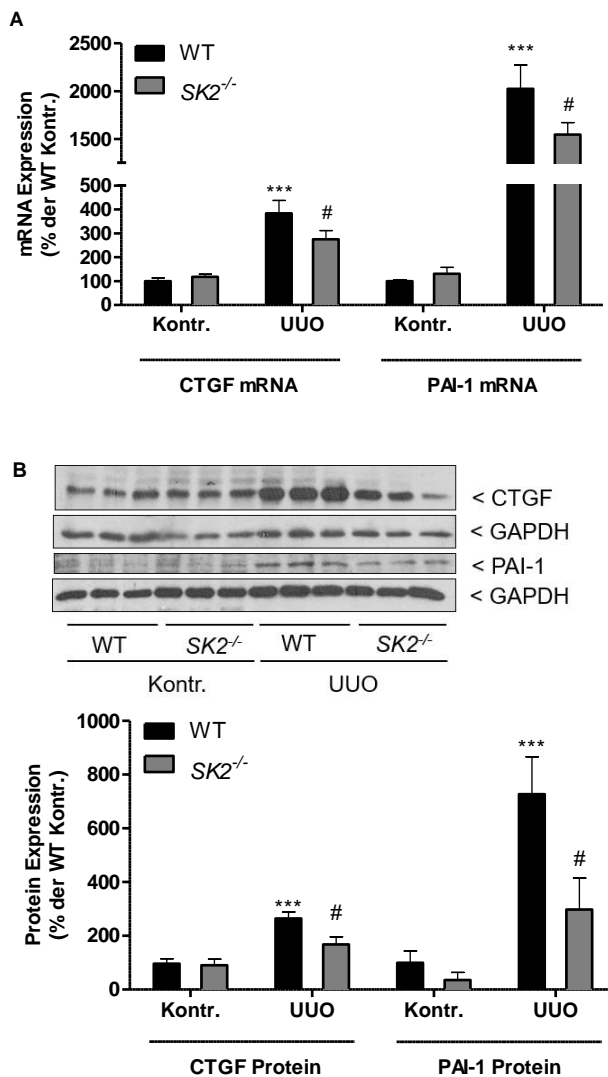


Abb. 13: CTGF- und PAI-1-Expression in Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen nach UUO
 Zur Bestimmung der mRNA-Expression von CTGF und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) (A) wurde eine Real-Time-PCR wie unter 2.5.4 beschrieben durchgeführt. Die Expression von CTGF und PAI-1 ist dabei als Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM in % der jeweilig korrespondierenden, unbehandelten Niere dargestellt. *** $p < 0,001$ ist signifikant gegen die jeweilige Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ ist signifikant gegen UUO der WT-Nieren. Die Statistik wurde durch 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test analysiert. Für die Analyse mittels Western Blot (B) wurden 50 μ g Protein des Nierenlysates eingesetzt. Die Bande von CTGF ist bei 38 kDa sichtbar, PAI-1 bei 45 kDa und GAPDH (36 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet. In der Quantifizierung wurde die Protein-Expression von CTGF und PAI-1 als Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM in % der unbehandelten WT-Niere dargestellt (n=7-10). *** $p < 0,001$ ist signifikant gegen die Kontrollnieren der Wildtyp-Mäuse, # $p < 0,05$ ist signifikant gegen die UUO-Niere der Wildtyp-Mäuse. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2way ANOVA.

Weitere wichtige Fibrosemarker sind Fibronectin 1 (FN1), Kollagen 1 (Col1) und *alpha-smooth-muscle actin* (α -SMA). Diese wurden ebenso untersucht und es zeigte sich die gleiche Regulation durch UUO und SK2-Deletion wie bei CTGF und PAI-1 (Abb. 14).

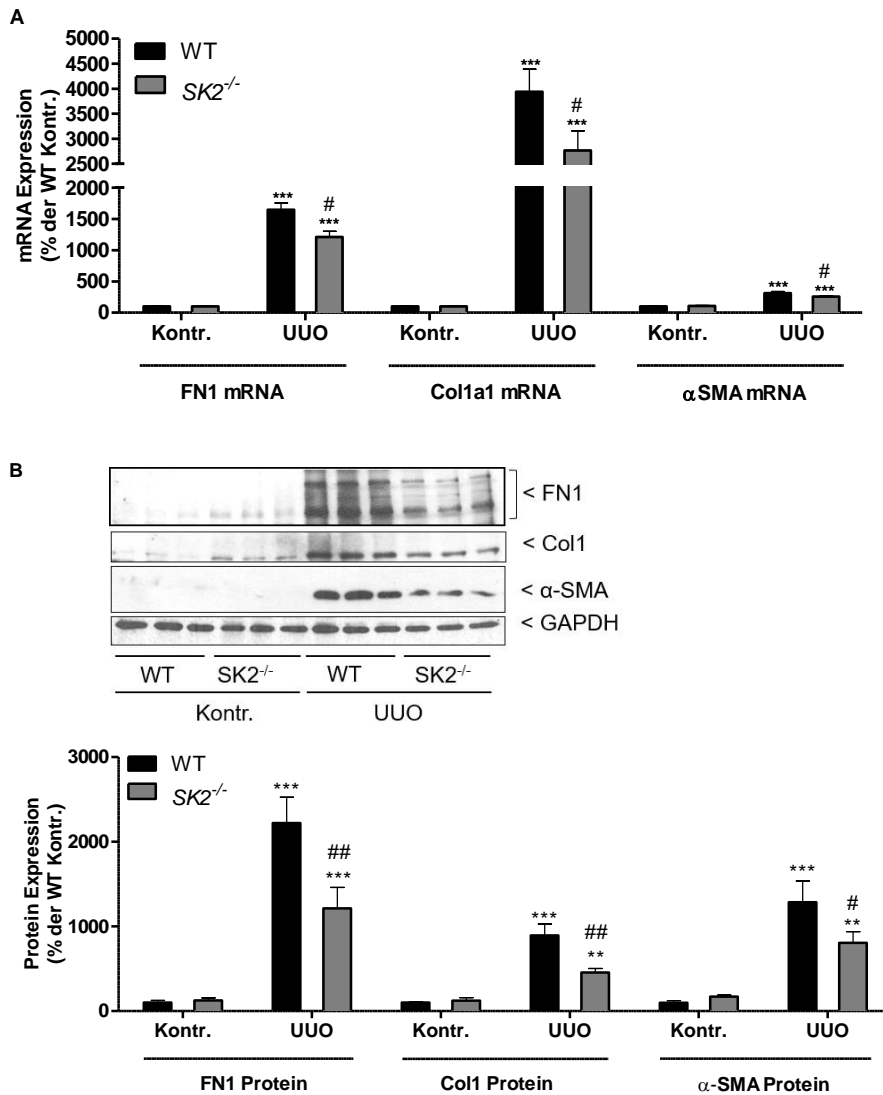


Abb. 14: Fibronectin-, Kollagen- und α -SMA-Expression in Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen nach UUO
Für die Analyse der mRNA-Expression von Fibronectin (FN1), Kollagen 1 (Col1 α 1) und α -SMA (A) wurde eine Real-Time-PCR wie unter 2.4.4 beschrieben durchgeführt. Die Daten werden jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM in % der UUO-Niere der WT-Mäuse dargestellt. Für die Western Blots in B wurden 50 μ g Protein verwendet. FN1 bildet mehrere Banden bei 250 kDa, Col1 bei 130 kDa und α -SMA bei 37 kDa. GAPDH (36 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet. **p < 0,01, ***p < 0,001 ist signifikant gegen die Wildtypkontrolle, #p < 0,05, ##p < 0,01 gegen die UUO-Niere der WT-Kontrolle mittels 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test (n=7-10).

In einem weiteren Ansatz wurde fibrotisches Gewebe und die verschiedenen Fibrosemarker in Nierenschnitten untersucht. Die PAS- (2.8.5) und Azan-Färbetechniken (2.8.4) können zur Identifizierung von Bindegewebe in Gewebsschnitten verwendet werden. Die Ergebnisse dieser Färbungen sind in Abb. 15 A und B exemplarisch dargestellt. Die kontralaterale

Kontroll-Niere zeigte jeweils keine Veränderung zwischen Wildtyp und SK2^{-/-}. Mit Hilfe der PAS-Färbung wurde der tubuläre Schaden der UUO-Nieren analysiert. Hierbei war kein signifikanter Unterschied zwischen SK2^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen erkennbar. In der Azan-Färbung war deutlicher eine Blaufärbung der UUO-Nieren zu erkennen. Dabei war auch zu beobachten, dass diese Blaufärbung in den UUO-Nieren der SK2^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen geringer auftrat. Des Weiteren wurde α -SMA (2.8.6) als Marker aktiver Fibroblasten in den Nierenschnitten detektiert. Die bräunlich gefärbten Fasern waren in den UUO-Nieren zu erkennen. Beim Vergleich der UUO-Nieren der Wildtypen mit den SK2^{-/-} fiel auf, dass bei den SK2^{-/-}-Mäusen weniger Fasern angefärbt waren. Mit der Sirius Red Färbung (2.8.3) in Abb. 15 D werden spezifisch Kollagenfasern angefärbt. In den Kontrollen waren aus diesem Grund nur wenige Fasern zu sehen. In den UUO-Nieren dagegen waren die Fasern gut sichtbar. Wie auch in der Quantifizierung in Abb. 15 G der Sirius Red Färbung dargestellt ist, waren in den UUO-Nieren der SK2^{-/-}-Mäuse weniger Kollagenfasern zu detektieren. Zusätzlich wurde in den Schnitten die Makrophagen-Infiltration durch F4/80 Färbung untersucht (2.8.7). In den jeweiligen Kontrollnieren waren nur vereinzelte Makrophagen erkennbar, während in den Schnitten der UUO-Mäuse eine Makrophagen-Infiltration durch die braune Färbung zu erkennen war. Diese Infiltration war in den Wildtyp-UUO-Nieren allerdings viel stärker als in den SK2^{-/-}-UUO-Nieren. Dies wurde durch die Quantifizierung der Menge an Makrophagen in Abb. 15 H bestätigt, die eine signifikant verminderte Makrophagen-Infiltration in den SK2^{-/-}-UUO-Nieren darstellte.

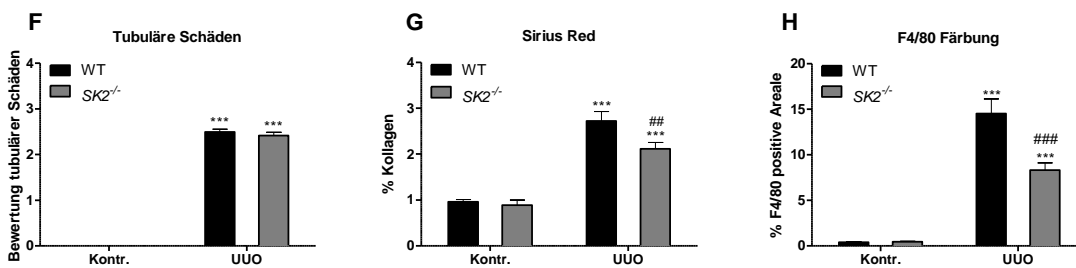
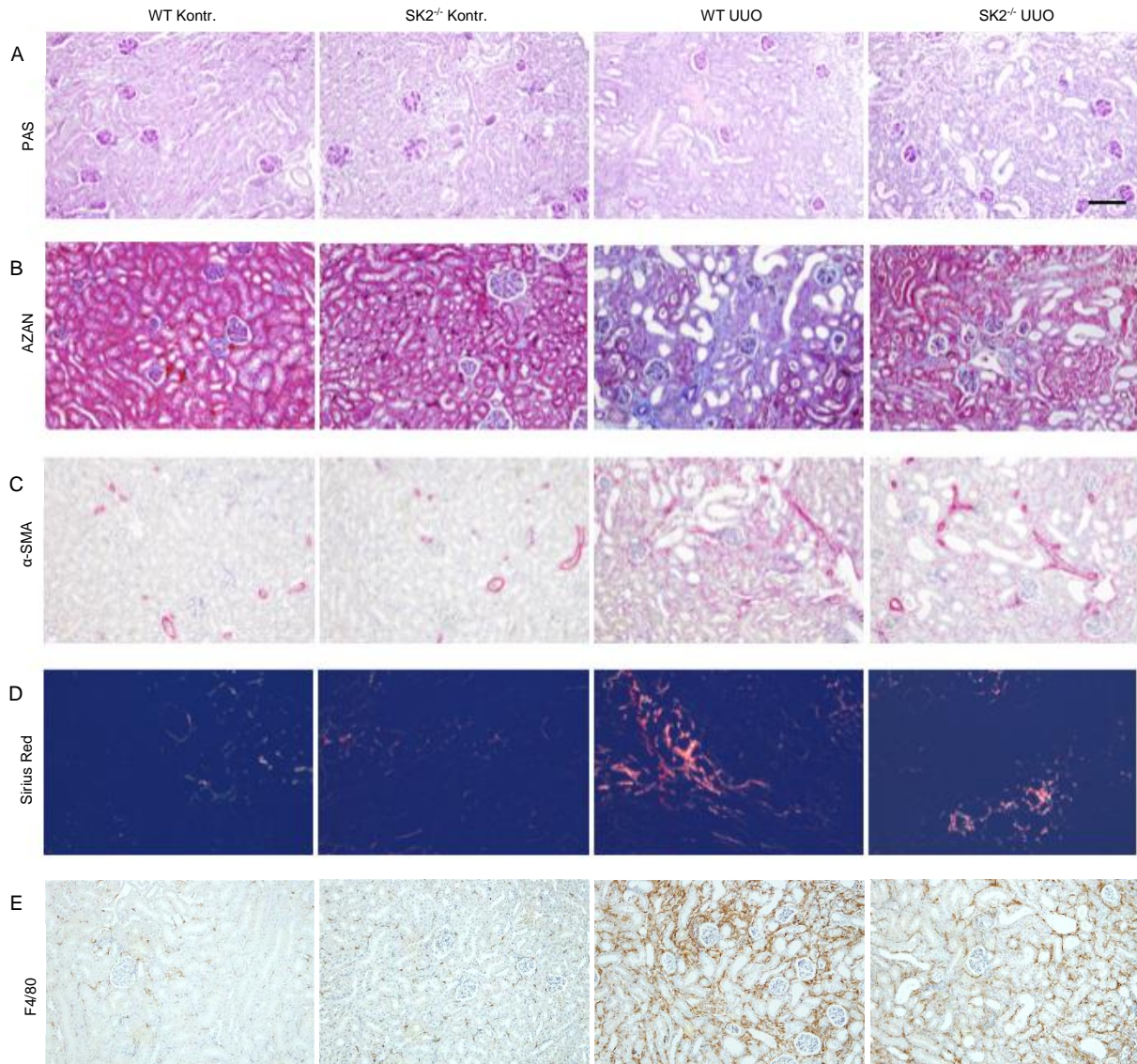


Abb. 15: Immunochemischer Nachweis von Fibrosemarkern in Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen nach UUO. Durch immunochemischen Nachweis wurden Nierenschnitte mittels PAS (A) (2.8.5), AZAN (B) (2.8.4), α-SMA (C) (2.8.6), Sirius Red (D) (2.8.3) und F4/80 (E) (2.8.7) hinsichtlich der Fibrose untersucht. Es wurden exemplarische Schnitte dargestellt und mit einer Größe von 200 µm für den Messbalken. Die Sirius Red Färbung (D) wurde unter polarisiertem Licht aufgenommen um die Kollagenfasern darzustellen. F-H zeigen die Quantifizierung des tubulären Schadens (F), der Sirius Red Färbung (G) und die positiven Areale der F4/80-Makrophagenfärbung (H) ausgewertet mit ImageJ und dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung ±SEM der Wildtyp-Kontrolle. ***p<0,001 ist signifikant gegen die jeweilige Kontrollniere, ##<0,01, ###<0,001 ist signifikant gegen die Wildtyp-UUO-Niere mittels 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test. (n=7-8)

3.1.1.3. TGF β -Signalweg im Modell der unilateralen Ureterobstruktion

Der TGF β -Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Nierenfibrose wie unter 1.3 beschrieben. Deshalb wurden in Abb. 16 Komponenten dieses Signalweges untersucht. In Abb. 16 A ist der Phosphorylierungsstatus von Smad2 und Smad3 mittels Western Blot Analyse dargestellt. Das phosphorylierte Smad2 stieg in den UO-Nieren beider Maus-Genotypen an. Allerdings war ein signifikant geringerer Anstieg des Phosphorylierungsstatus in den UO-Nieren der SK2^{-/-}-Mäuse zu erkennen. Die gleiche Beobachtung wurde auch für das phosphorylierte Smad3 gemacht. In den UO-Nieren war die aktive und phosphorylierte Form von Smad3 erhöht, während in den SK2^{-/-}-UO-Nieren signifikant weniger phosphoryliertes Smad3 detektiert werden konnte. Da Smad7 als inhibitorisches Smad beschrieben wurde (1.3), welches die Aktivierung von Smad2 und 3 durch den TGF β -Rezeptor hemmt, wurde dieses inhibitorische Smad7 hier auch untersucht. In den SK2^{-/-}-Nierengeweben war im Vergleich zu den Kontroll-Nierengeweben bereits eine erhöhte basale Expression von Smad7 zu erkennen. Durch UO stieg die Smad7-Expression in beiden Gruppen an, der Anstieg war jedoch signifikant stärker in den SK2^{-/-}-Nierengeweben. Während in den Wildtyp-Mäusen erst eine Expression von Smad7 durch die UO detektierbar war, stieg die Expressionsrate in den SK2^{-/-}-Mäusen durch die Obstruktion signifikant an.

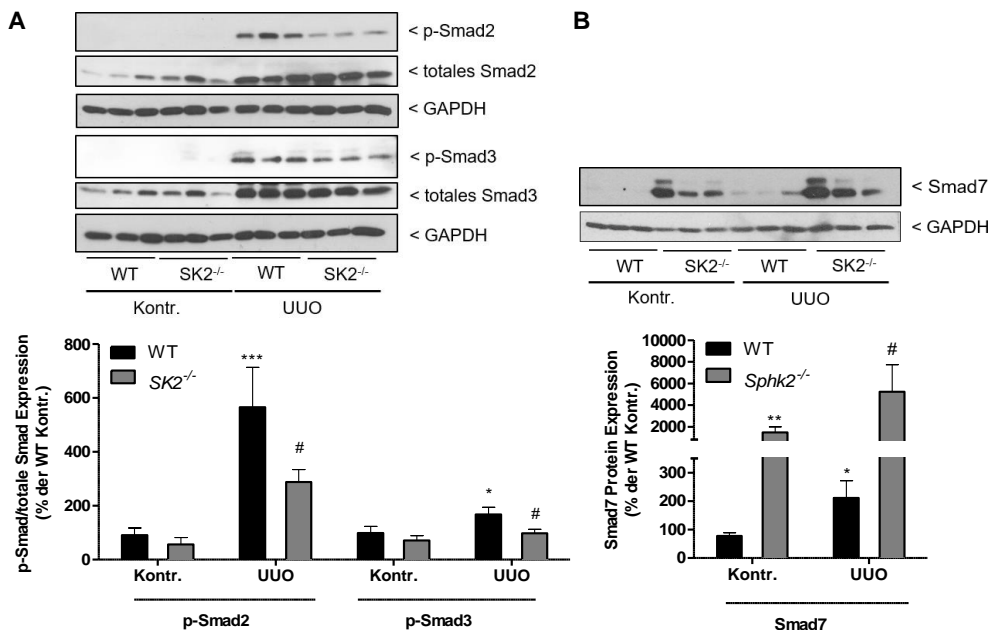


Abb. 16: Analyse des Smad-Signalweges in Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen nach UO

Zur Analyse des Smad-Signalweges wurden 50 μ g Protein für den Western Blot verwendet. In der Quantifizierung sind die Daten als % der Wildtyp Kontroll-Nieren dargestellt. Bei p-Smad2 (60 kDa) und p-Smad3 (52 kDa) (A) wurde jeweils die phosphorylierte, sowie die totale Form der Proteine analysiert. Die phosphorylierte Form wurde anschließend auf die totale Form referenziert. Bei Smad7 (46 kDa) (B) wurde die Protein-Expression auf die Ladekontrolle GAPDH (36 kDa) referenziert. Die Daten werden jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM in % der Wildtyp-Kontrollnieren dargestellt (n=7-10). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ist signifikant gegen die Wildtyp-Kontrollniere, #p<0,05 ist signifikant gegen die UO-Niere der Wildtypen (WT) mittel 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test.

3.1.1.4. Sphingolipid-Metabolite im Modell der unilateralen Ureterobstruktion

Mittels LC-MS/MS-Analyse (2.7) wurden Metabolite des Sphingolipid-Signalweges in Plasma- und Gewebeproben untersucht. Da der Verlust der SK2 in den SK2^{-/-}-Mäusen eine wichtige Rolle spielen kann, wurde die Messung für Sphingosin und S1P als Edukt und Produkt der Sphingosinkinase analysiert. Bei den Plasma-Proben entspricht die Kontrolle den Plasmawerten vor der Obstruktion und die UO-Werte den Plasmaspiegeln nach der Obstruktion. Bei den Gewebe-Proben handelt es sich um die obstruierte Niere und die kontralaterale Niere als Kontrolle. In der Sphingosin-Analyse des Plasmas in Abb. 17 A ist zu sehen, dass die SK2^{-/-}-Mäuse bereits basal eine signifikante Erhöhung der Sphingosin-Spiegel aufwiesen. Durch UO war bei beiden Genotypen ein signifikant erhöhter Sphingosin-Spiegel zu beobachten, wobei die Spiegel in den SK2^{-/-}-UO-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zusätzlich erhöht war. Die Messung der S1P-Plasmaspiegel in Abb. 17 B ergab ebenfalls bereits signifikant erhöhte S1P-Konzentrationen in den SK2^{-/-}-Mäusen. Während die S1P-Plasmaspiegel der Wildtyp-Mäuse durch UO signifikant anstiegen, blieben die S1P-Plasmaspiegel in den SK2^{-/-}-UO-Mäusen konstant hoch. Die Spiegel von S1P und Sphingosin wurden ebenfalls in Nierengewebe gemessen (Abb. 17 C und D). Wie bereits in der Messung des Plasmas zu sehen, war der Sphingosin-Spiegel in den SK2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen schon basal signifikant erhöht. Durch UO stiegen die Sphingosin-Spiegel beider Genotypen an, wobei der Anstieg in den SK2^{-/-}-Mäusen stärker als in den Wildtypen war. Bei den S1P-Messungen im Gewebe verdoppelte sich der S1P-Spiegel durch UO in den Wildtypen, sowie in den SK2^{-/-}-Mäusen signifikant. Dabei war allerdings weder basal, noch nach der Obstruktion ein Unterschied der S1P-Spiegel zwischen Wildtypen und SK2^{-/-}-Mäusen zu erkennen.

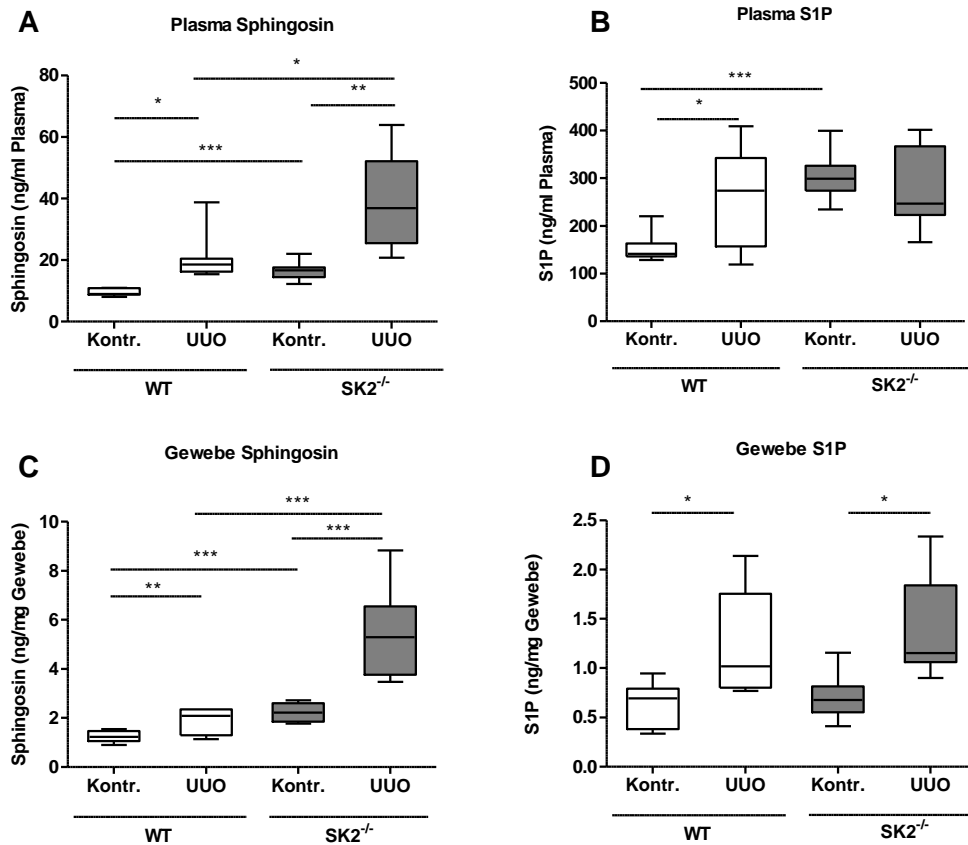


Abb. 17: Quantifizierung von Sphingosin und S1P in Plasma und Nierengewebe von SK2^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach UUO

Die LC-MS/MS-Analyse (2.7) wurde genutzt um die Sphingolipid-Metabolite Sphingosin und S1P in Plasma (A, B) und Nierengewebe (C, D) zu analysieren. Das Plasma wurde vor Beginn der UUO (kontr.) und nach 7 Tagen UUO aus entnommenem Blut gewonnen. Das Nierengewebe stammt aus der obstruierten Niere (UUO) und der kontralateralen Kontrollniere (Kontr.). Die Ergebnisse sind als Boxen dargestellt um den Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM, sowie maximale und minimale Konzentrationen darzustellen (n=7-8). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ist signifikant gegen die jeweils angezeigten Vergleichswerte. Die Statistik wurde durch 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test bestimmt.

3.1.2. SK2-Defizienz in Fibroblasten und tubulären Zellen

Um die Ergebnisse des erhöhten Sphingosin-Spiegels der SK2^{-/-}-Mäuse näher zu untersuchen, wurden *in vitro* Versuche mit Wildtyp- und SK2^{-/-}-Nierenfibroblasten, sowie humanen tubulären HK2 Zellen durchgeführt. In Abb. 18 sind die Ergebnisse mit Wildtyp- und SK2^{-/-}-Fibroblasten aus Schwalm et al. 2017 abgebildet. Diese Ergebnisse werden nur der Vollständigkeit halber gezeigt und wurden nicht selbst generiert. Da Fibroblasten bekanntermaßen durch TGFβ aktiviert werden können, wurden die Zellen hier mit TGFβ stimuliert. Wie in Abb. 18 A deutlich zu sehen ist, wurde durch TGFβ die CTGF Protein-Expression in den Wildtyp-Fibroblasten sowohl im Zelllysate, als auch in den Zellüberständen deutlich stärker erhöht als in den SK2^{-/-}-Fibroblasten. In der Anwesenheit eines SK-Inhibitors (SKI II), der die Phosphorylierung des Sphingosin zu S1P verhindert, wurde die Expression von CTGF sowohl im Zelllysate als auch im Zellüberstand vermindert. Auch in diesen Zellen wurde das Smad7 untersucht und es zeigte sich, dass in den SK2^{-/-}-Fibroblasten eine erhöhte Smad7-Expression stattfindet, wie unter 3.2.1.3 bereits für die Nierenlysate der SK2^{-/-}-Mäuse beschrieben. Die Smad7-Expression konnte durch Zellstimulation mit Sphingosin und auch durch zusätzlich Stimulation mit dem SK-Inhibitor SKI II auf das Niveau in SK2^{-/-}-Fibroblasten gebracht werden (Abb. 18 D). Als weiterer Fibrosemarker wurde Kollagen in den Nieren-Fibroblasten untersucht. Dazu wurde mittels eines *Sirius Red Assays* die Kollagen-Bildung nach TGFβ-Stimulation analysiert. Durch die TGFβ-Stimulation stieg die Kollagen-Bildung in den Wildtyp-Fibroblasten signifikant an, während sie in den SK2^{-/-}-Fibroblasten konstant blieb (Abb. 18 E). Weder in den Wildtyp-Zellen, noch in den SK2^{-/-}-Zellen wurde dies durch exogenes Sphingosin verändert. Durch die Zugabe des SK-Inhibitors SKI II wurde die Kollagen-Bildung der Wildtyp-Fibroblasten wieder auf das Level der SK2^{-/-}-Fibroblasten gesenkt.

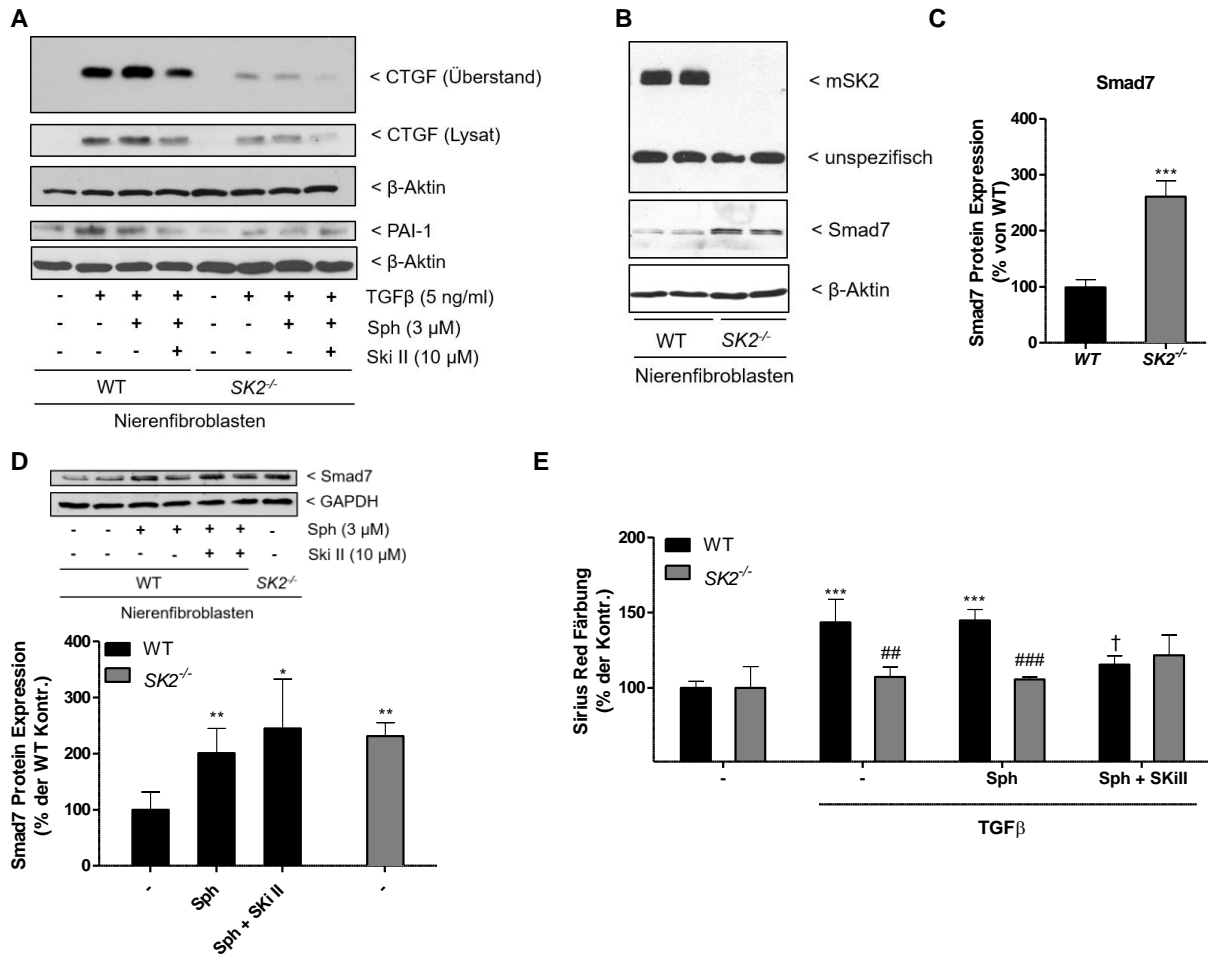


Abb. 18: Auswirkung einer SK2-Defizienz in Maus-Nierenfibroblasten auf den Smad Signalweg und einige fibrotische Markerproteine

Zur Beobachtung der Sphingosin-Effekte auf SK2^{-/-}-Fibroblasten und die entsprechenden Wildtypen (WT) wurden die Zellen mit 10 μmol/L SK-Inhibitor SKI II für 30 Minuten vorinkubiert, worauf eine Inkubation mit 5 ng/mL TGFβ und mit bzw. ohne 3 μmol/L Sphingosin für 48 Stunden folgte. In A sind die Western Blots von CTGF (38 kDa) in Zellysaten und Überstand, sowie von PAI-1 (45 kDa) in Zellysaten nach der jeweiligen Stimulation dargestellt. Unter den gleichen Voraussetzungen wurde ein *in vitro* Sirius Red Assay (E) zur Analyse der Kollagen-Akkumulation durchgeführt. In (B) wurde mittels Western Blot die Expression der SK2 (68 kDa) und Smad7 (46 kDa) in Wildtyp- und SK2^{-/-}-Fibroblasten dargestellt. Die Quantifizierung der Smad7-Expression ist in (C) dargestellt. Zur weiteren Smad-Analyse wurden die Wildtyp-Zellen mit 3 μM Sphingosin und mit bzw. ohne 10 μM SK-Inhibitor SKI II für 4 Stunden inkubiert (D). Für die Abb. 18 A, B und D wurde β-Aktin (42 kDa) bzw. GAPDH (36 kDa) als Ladekontrolle verwendet. Die densitometrische Auswertung zu den Western Blots (C) ist in (D) abgebildet und zeigt die Smad7-Expression bezogen auf die Wildtyp-Kontrolle. Die Daten in (D) und (E) werden jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung ±SD in % der Wildtyp-Kontrollen dargestellt. Alle Ergebnisse bestehen aus drei unabhängigen Experimenten, die Western Blots sind repräsentative Ergebnisse. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ist signifikant gegen die Wildtyp-Kontrolle und ##p<0,01, ###p<0,001 ist signifikant gegen die jeweilige Wildtyp-Stimulation, †p<0,05 ist signifikant gegen die Wildtyp-TGFβ-Stimulation mittels 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test. Modifiziert aus Schwalm et al. 2017

Da in der tubulointerstitiellen Fibrose ebenfalls tubuläre Zellen eine große Rolle spielen, wurden weitere Versuche mit der humanen tubulären Epithelzelllinie HK2 durchgeführt. Durch die Behandlung mit SK2 spezifischen siRNAs konnte die Expression der SK2 wie in Abb. 19 A gezeigt transient um ca. 75% herunterreguliert werden (2.2.7). Die nachfolgende Zellstimulation mit TGF β führte zur Hochregulation CTGF-Expression, die wiederum in den mit SK2 siRNA behandelten HK2-Zellen vermindert war (Abb. 19 C, D). Des Weiteren konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Smad7-Expression in den mit SK2 siRNA behandelten HK2-Zellen gezeigt werden, was mechanistisch zu einer Verminderung des CTGF beitragen könnte (Abb. 19 B).

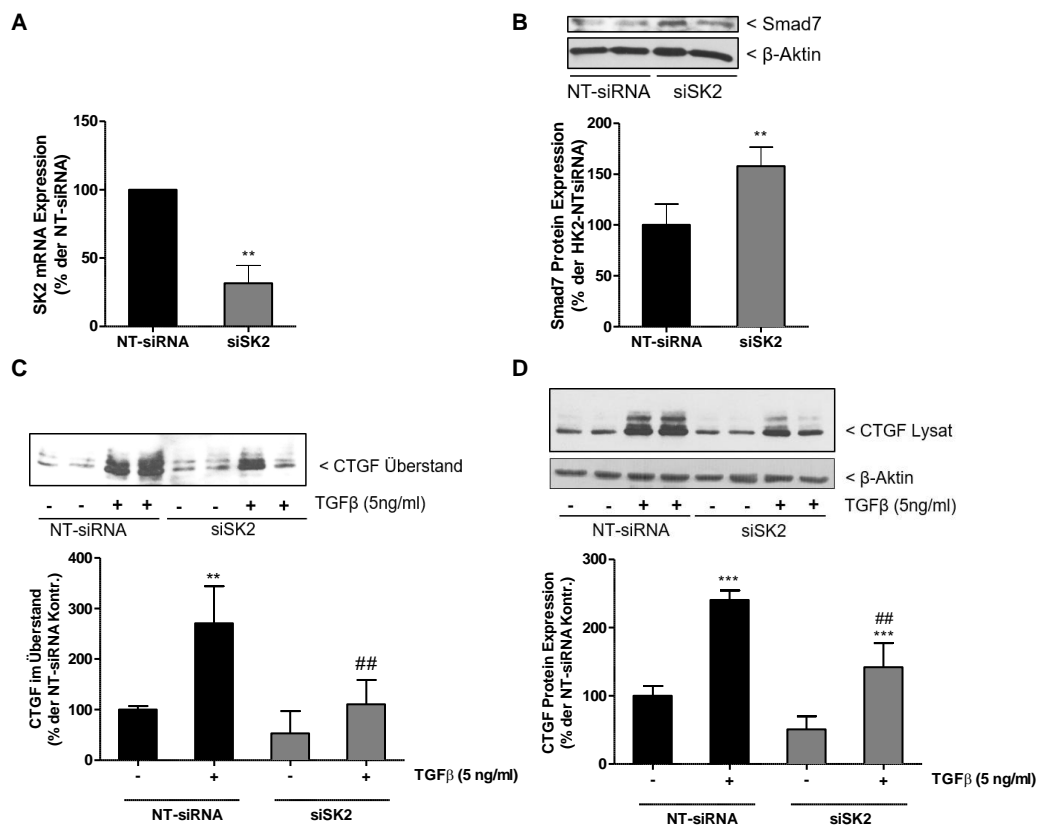


Abb. 19: Wirkung einer verminderten SK2-Expression in tubulären HK2-Zellen auf die CTGF- und Smad7-Proteinexpression

Wie unter 2.2.7 beschrieben, wurden die HK2-Zellen mit siRNA gegen SK2, sowie mit non-target (NT-) siRNA zur Kontrolle behandelt. In (A) wurde die Herunterregulation der SK2 auf mRNA-Ebene charakterisiert. In (B) wurde auch die Protein-Expression von Smad7(46 kDa) analysiert. Weiterhin wurde mittels Western Blot die CTGF-Expression (38 kDa) mit und ohne TGF β -Stimulation (5 ng/mL für 4 Stunden) in den Zellüberständen (C) und Zelllysaten (D) ermittelt. Die Auswertung zeigt jeweils den Mittelwert mit Standardabweichung \pm SD in % der Wildtyp-Kontrollen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Western Blots sind repräsentative Ergebnisse. **p<0,01, ***p<0,001 ist signifikant gegen die NT-siRNA-Kontrolle, ##p<0,01 ist signifikant gegen die NT-siRNA-Stimulation mittels für T-Test für A und B und 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test für C und D.

3.1.3. hSK2 Kontrollen und hSK2 überexprimierende Mäuse

3.1.3.1. Charakterisierung der SK2 im Modell der unilateralen Ureterobstruktion

Auch mit den hSK2 tg Mäusen, sowie den entsprechenden hSK2 +stop Kontrollen wurde die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) wie unter 2.3 beschrieben durchgeführt. Die Nierenlysate wurden aufgearbeitet und nach 2.5.2 der Proteingehalt bestimmt. Für SDS-PAGE (2.5.5) und anschließender Western Blot Analyse (2.5.6) wurde von den Nierenlysaten 50 µg Protein eingesetzt. Der SK2-Aktivitätsassay erfolgte wie in 2.6.1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt.

Dabei wurde zunächst mittels Western Blot sichergestellt, dass die humane SK2 in den hSK2 tg-Mäusen, nicht jedoch in den Kontrollen als 68 kDa Protein exprimiert wird. Durch einen SK2-Aktivitätsassay wurde zusätzlich bestätigt, dass die überexprimierte humane SK2 auch aktiv ist. In den hSK2 tg-Maus-Nierenlysaten wurde eine etwa fünffach erhöhte SK2-Aktivität gemessen.

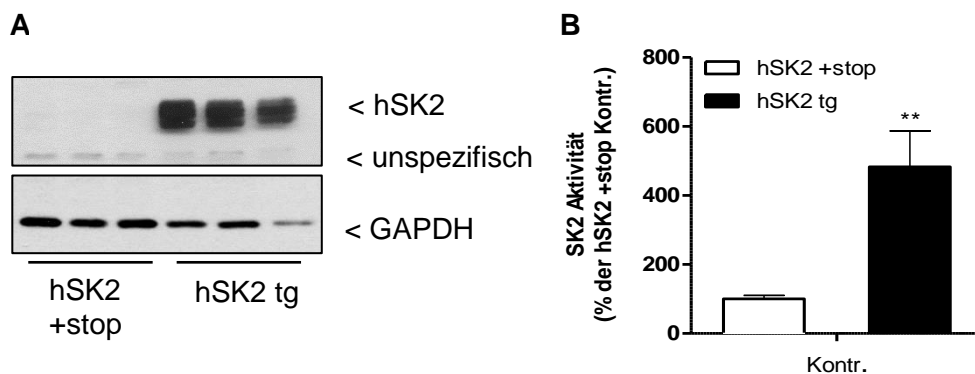


Abb. 20: SK2-Expression und -Aktivität in hSK2 tg-Nieren

Für die Western Blot Analyse der humanen SK2 wurden 50 µg Protein der Nierenlysate verwendet. Die Bande der SK2 läuft bei 68 kDa. Darunter befindet sich eine unspezifische Bande. Der Aktivitätsassay der SK2 wurde mit 10 µg Protein der Kontrollnieren durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM in % der hSK2 Kontrollen dargestellt (n=6-8). **p<0,01 ist signifikant gegen hSK2 +stop mittels T-Test.

3.1.3.2. Fibrosemarker im Modell der unilateralen Ureterobstruktion

Da durch die unilaterale Ureterobstruktion eine tubulointerstitielle Fibrose induziert wird, wurden hier die Fibrosemarker CTGF, Kollagen 1 und α -SMA untersucht. In Abb. 21 ist die Expression von CTGF auf mRNA- (Abb. 21 A) und Protein-Ebene (Abb. 21 B) dargestellt. Durch UUO stieg die CTGF-Expression in den UUO-Nieren sowohl in den Kontrollen hSK2 +stop als auch in den hSK2 tg-Mäusen signifikant auf mRNA-Ebene auf das Doppelte und auf Protein-Ebene auf das Dreifache an. In den hSK2 tg-Mäusen wurde im Vergleich zu den Kontrollmäusen nach UUO eine signifikant höhere Expression von CTGF mRNA und Protein gemessen.

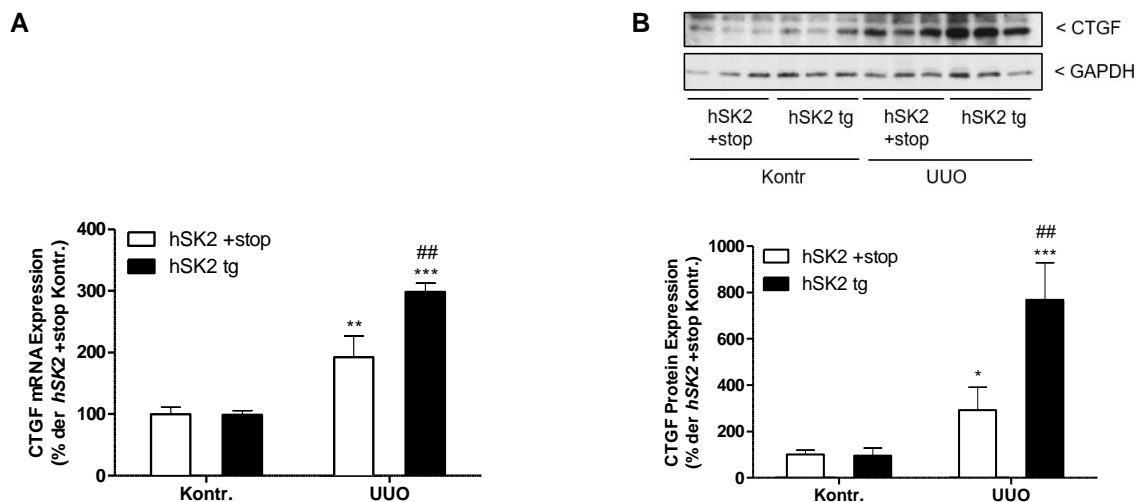
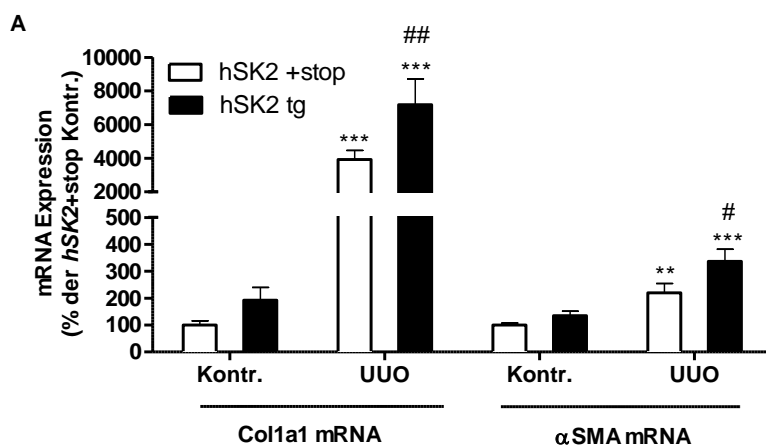


Abb. 21: CTGF-Expression in hSK2 +stop und hSK2 tg Mäusen nach UUO

Zur Bestimmung der CTGF mRNA-Expression (A) wurde eine Real-Time-PCR wie unter 2.4.4 beschrieben durchgeführt. Die Daten sind als Induktion gegenüber der Wildtyp-Kontrollniere dargestellt. Zur Analyse der Protein-Expression (B) wurden 50 µg Protein der Nierenlysate verwendet (2.6.6). CTGF hat eine Masse von 38 kDa. GAPDH (36 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet. In der Quantifizierung sind die Daten als Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM in % der Kontrollniere (Kontr.) hSK2 +stop dargestellt (n=6-8). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ist signifikant gegenüber der Kontrollniere hSK2 +stop, ###p<0,01 ist signifikant gegenüber der UUO-Niere der Kontrollmaus hSK2 +stop. Die Statistik mit 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test durchgeführt.

In Abb. 22 wurden die mRNA- und Protein-Expressionsraten von Kollagen-1 und α -SMA untersucht. Durch UUO wurde auch die Expression von Kollagen-1 und α -SMA signifikant hochreguliert, welche in hSK2 tg-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen zusätzlich erhöht war (Abb. 22 A). Die gleiche Regulation wurde auch auf Protein-Ebene detektiert (Abb. 23 A).



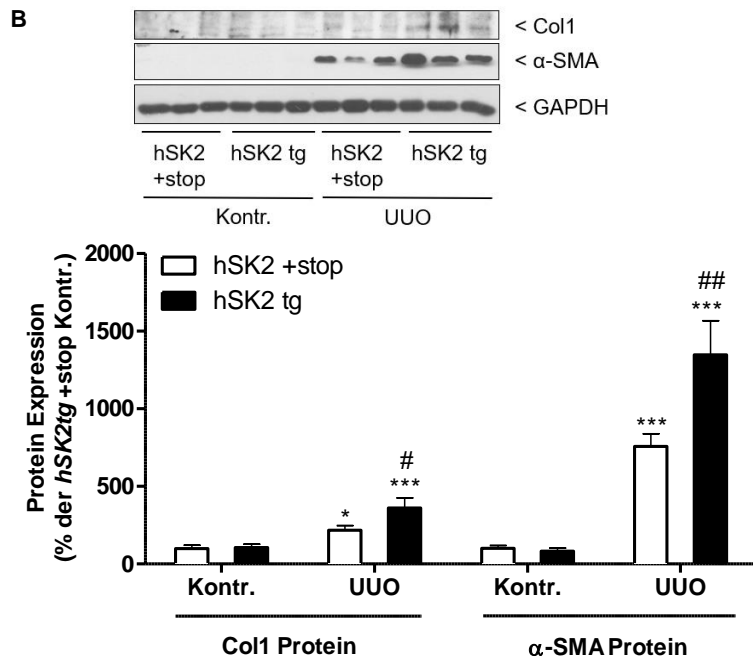


Abb. 22: Auswirkung einer systemischen hSK2 Überexpression in Mäusen auf die durch UUO ausgelöste Kollagen 1- und α-SMA-Expression in der Niere
 Die Analyse der mRNA-Expression (A) von Col1 und α-SMA erfolgte mittels Real-Time-PCR wie unter 2.5.4 beschrieben. Für die Protein-Analyse (B) wurden 50 µg Protein der Nierenlysate verwendet. Col1 hat eine Masse von 130 kDa und α-SMA von 37 kDa. GAPDH (36 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet. In der Quantifizierung werden die Daten als Mittelwert mit Standardabweichung ±SEM % der UUO-Nieren der Kontroll-Mäuse dargestellt (n=6-8). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ist signifikant gegen die hSK2 +stop Kontrolle (Kontr.), #p<0,05 ##p<0,01 ist signifikant gegen die UUO-Niere der hSK2 +stop Mäuse. Die Statistik erfolgte mittels 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test.

Wie bei den Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen wurden auch in diesem Fall immunhistologische Färbungen von Schnitten angefertigt, wie unter 2.8 beschrieben, um Fibrosemarker sichtbar zu machen. Die PAS- und AZAN-Färbungen (Abb. 23 A, B) zeigen, dass die hSK2 tg-Mäuse eine stärkere Bindegewebsexpression im Vergleich zu den Kontrollmäusen aufwiesen. Mittels der PAS-Färbung konnte außerdem eine Analyse des tubulären Schadens vorgenommen werden (Abb. 23 F), welcher ebenso durch UUO ansteigt, jedoch keine Veränderung zwischen hSK2 tg und Kontrollmäusen zeigte. Die α-SMA (2.8.6) zeigt, dass die hSK2 tg-Mäuse mehr α-SMA als die Kontrollmäuse aufwiesen. Auch die Anfärbung der Kollagenfasern durch die Sirius Red Färbung war deutlich stärker ausgeprägt in den hSK2 tg-UUO-Mäusen als in den UUO-Kontrollmäusen (Abb. 23 D, G). Die Makrophagen-Infiltration wurden mittels eines Antikörpers gegen F4/80 analysiert. Durch UUO wird eine Infiltration der Makrophagen induziert, die in den hSK2 tg-Mäusen stärker ausfiel als in den Kontrollmäusen (Abb. 23 E, H).

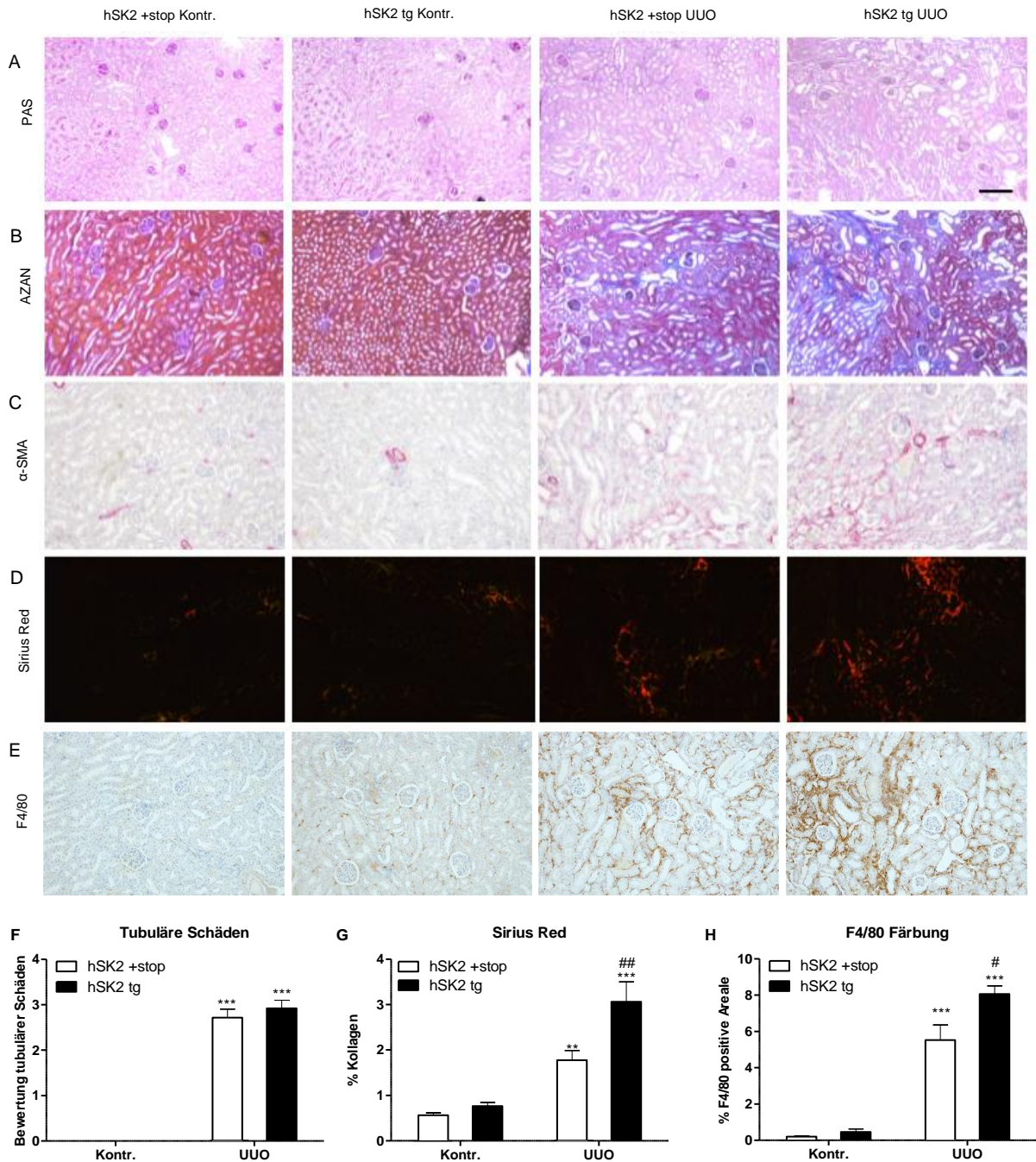


Abb. 23: Immunochemischer Nachweis von Fibrosemarkern in hSK2 +stop und hSK2 tg Mäusen nach UUO

Der Nachweis mittels Immunochemie auf Nierenschnitte wurde mit PAS (A) (2.8.5), AZAN (B) (2.8.4), α -SMA (C) (2.8.6), Sirius Red (D) (2.8.3) und F4/80 (E) (2.8.7) hinsichtlich Fibrosemarker durchgeführt. Die gezeigten Schnitte sind exemplarischen und der Messbalken hat eine Größe von 200 μ m. Die Sirius Red Färbung (D) wurde unter polarisiertem Licht aufgenommen um die Kollagenfasern darzustellen. Die Graphen zeigen die Quantifizierung der tubulären Schäden (F), der Sirius Red Färbung (G) und die positiven Areale der F4/80-Makrophagenfärbung ausgewertet mit ImageJ und dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM der hSK2 +stop Kontrolle (Kontr.). (n=6-8) ***p<0,001 ist signifikant gegen die jeweilige Kontrollniere (Kontr.), #<0,05, ##<0,01 ist signifikant gegen die hSK2 +stop UUO-Niere. Die Statistik erfolgte durch 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test.

3.1.3.3. TGF β -Signalweg im Modell der unilateralen Ureterobstruktion

In 3.1.2.3 wurde bereits beschrieben, dass der TGF β -Signalweg eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Fibrose spielt. Dieser wurde in Abb. 24 anhand von der Phosphorylierung von Smad2 und Smad3, sowie der Expression von Smad7 in den Kontrollen und den hSK2 tg-Mäusen untersucht. Durch UO wurden Smad2 und Smad3 in Nierenlysaten vermehrt phosphoryliert (Abb. 24). Ebenso wurde Smad7 durch UO hochreguliert. Interessanterweise war jedoch Smad7 in den UO-hSK2 tg-Nieren im Vergleich zu den UO-Kontrollnieren reduziert, während die Phosphorylierung von Smad2 und 3 verstärkt war.

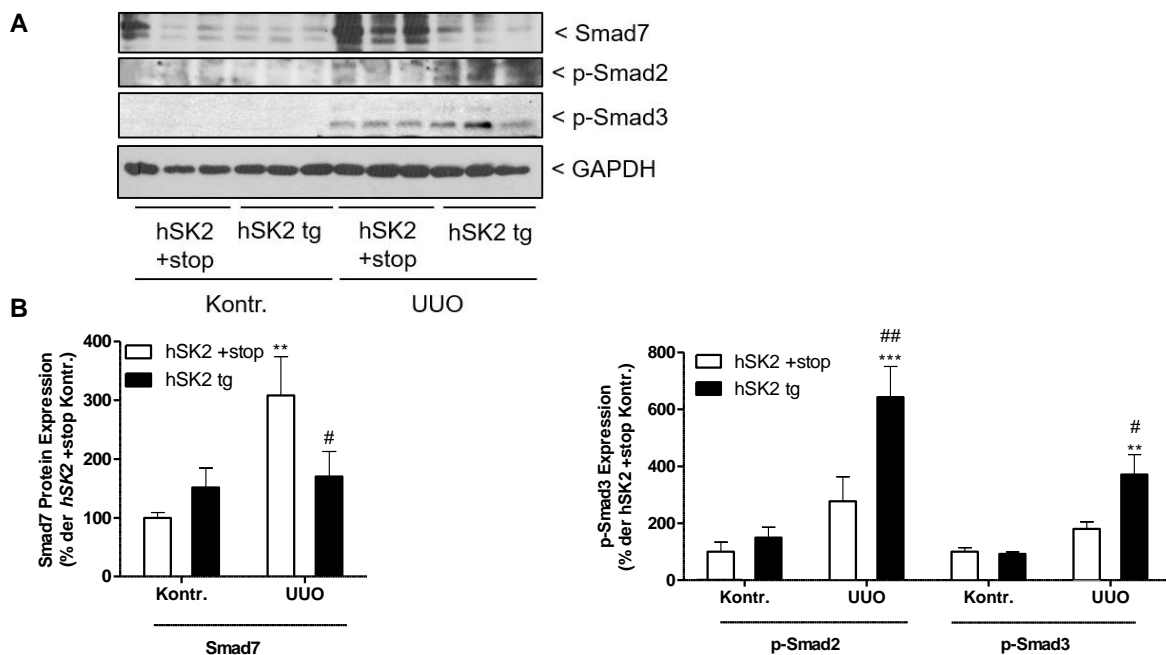


Abb. 24: Analyse des Smad-Signalweges in hSK2 +stop und hSK2 tg Mäusen nach UO

Zur Analyse des Phosphorylierungsstatus von Smad2 und Smad3, sowie der Expression von Smad7 wurden Western Blot Analysen mit 50 μ g Protein durchgeführt. Es sind Smad7 (46 kDa) und sowohl die phosphorylierte Form von Smad 2 (60 kDa) und Smad3 (52 kDa) sowie die totale Form dargestellt. GAPDH mit einem Molekulargewicht von 37 kDa wurde jeweils als Ladekontrolle verwendet. In der Quantifizierung ist die Protein-Expression als Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM in % der Kontrollniere (Kontr.) der hSK2 +stop Kontrollmäuse dargestellt (n=6-8). **p<0,01, ***p<0,001 ist signifikant gegenüber der Kontrollniere der Kontrollmäuse, #p<0,05, ##p<0,01 ist signifikant gegen die UO-Niere der Kontrollmäuse. Die Statistik wurde mittels 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test durchgeführt.

3.1.3.4. Sphingolipid-Metabolite im Modell der unilateralen Ureterobstruktion

Um die Metabolite Sphingosin und S1P in den Nieren- und Plasma-Proben der hSK2 tg-Mäuse und der entsprechenden Kontrollen zu messen, wurde die Methode der LC-MS/MS-Analyse verwendet. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 25 dargestellt. In den Kontroll-Mäusen war durch UO ein Anstieg des Sphingosin-Spiegels im Plasma sichtbar (Abb. 25 A), welcher in den

hSK2 tg-Mäusen nicht mehr detektierbar war. Auch in den Nierenlysaten war Sphingosin durch UUU erhöht, was in den hSK2 tg nicht mehr sichtbar war. Der Sphingosin-Spiegel war in den UUU-Nieren signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen. In den Messungen des S1P im Plasma und im Nierengewebe ließ sich sowohl vor und nach der Obstruktion kein Unterschied erkennen und auch unter den Genotypen ist keine Veränderung der S1P-Spiegel sichtbar.

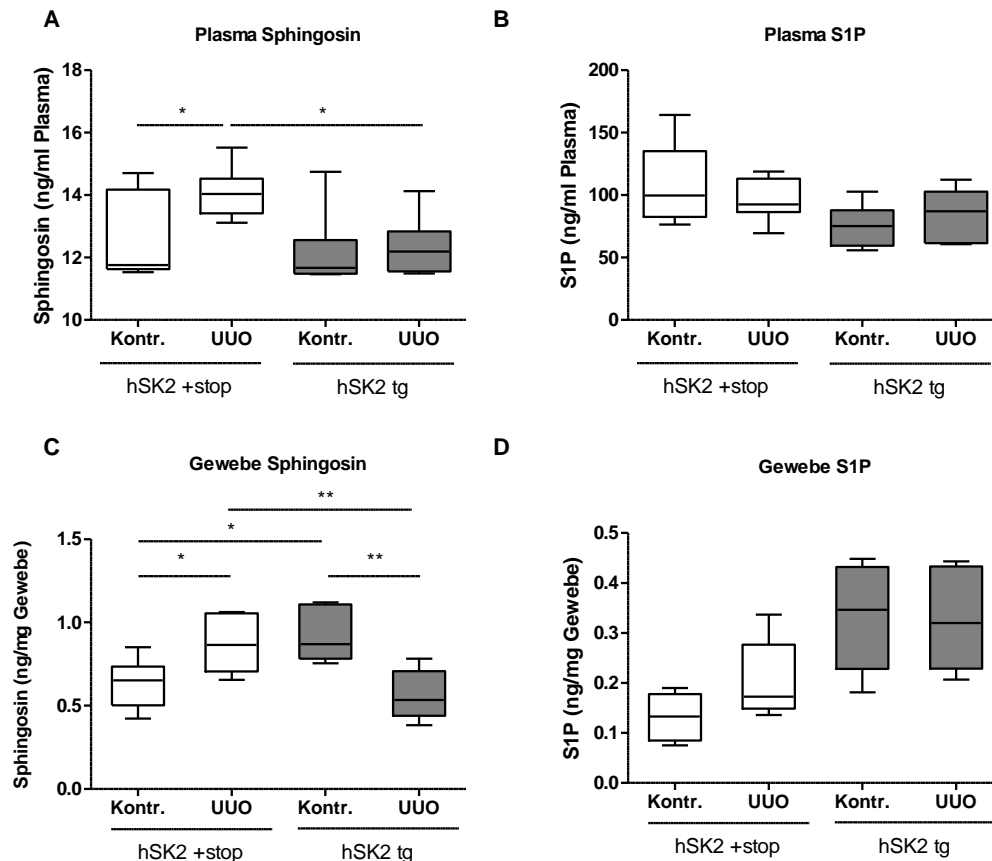


Abb. 25: Quantifizierung von Sphingosin und S1P in Plasma und Nierengewebe von hSK2 tg Mäusen und Kontrollmäusen nach UUO

Zur Quantifizierung von Sphingosin (Sph) und S1P in Plasma (A, B) und Nierengewebe (C, D) wurde die LC-MS/MS-Analyse (1.7) verwendet. Das Plasma wurde vor UUO (Kontr.) und 7 Tage nach UUO entnommenem Blut gewonnen. Das Nierengewebe stammt aus der obstruierten Niere (UUO) und der kontralateralen Kontrollniere (Kontr.). Die Ergebnisse sind als Boxen dargestellt um den Mittelwert mit Standardabweichung \pm SEM, sowie maximale und minimale Konzentrationen darzustellen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ist signifikant gegen die jeweils angezeigten Vergleichswerte mittels 2way ANOVA und Bonferroni-Post-Test.

3.2. Maus-Mesangiumzellen

3.2.1. Charakterisierung der Maus-Mesangiumzellen hinsichtlich der Sphingosinkinase 2

Zunächst wurden Lysate von Nieren sowie Mesangium-Zelllysate von Wildtyp (C57BL/6J), hSK2 +stop (Kontrollen) und hSK2 tg Mäusen (hSK2 überexprimierend) hinsichtlich ihrer Expression der SK2 untersucht. In den Zelllysaten wurde zusätzlich die Lokalisation und die Aktivität der SK2 charakterisiert. Die Nieren- und Zelllysate wurden aufgearbeitet wie unter 2.6 beschrieben und sind in Abb. 26 und 27 dargestellt. Sowohl in Abb. 26 in den Nierenlysaten der hSK2 tg Mäuse als auch den entsprechenden Zelllysaten in Abb. 27 ist eine spezifische Bande der humanen SK2 bei 68 kDa zu erkennen. In den Wildtyp- und hSK2 +stop Mäusen ist jeweils die murine SK2 exprimiert mit einer Bande bei 68 kDa. In den hSK2 tg Nieren- und Zelllysaten ist die murine SK2 in den Nieren- und Zelllysaten (Abb. 26, 27) herunterreguliert. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde dabei als Referenz verwendet. In den Zelllysaten wurde zusätzlich die mRNA Expression der hSK2 bestimmt wie unter 2.5.4 beschrieben. Wie zu erwarten war keine Expression der hSK2 in den Wildtyp-Zellen sichtbar. Die Expressionsspiegel der hSK2 in den hSK2 +stop könnte durch genomische DNA erklärt werden. In den hSK2 tg konnte eine deutliche Überexpression auf mRNA Level bestätigt werden.

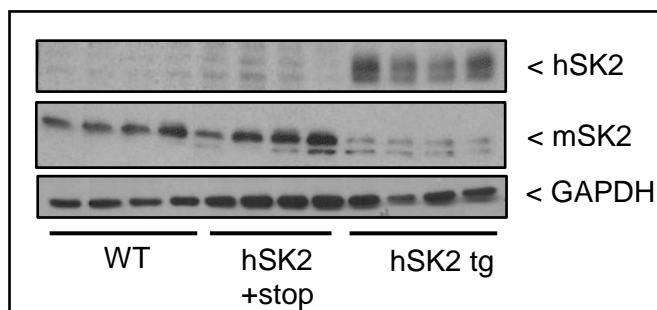
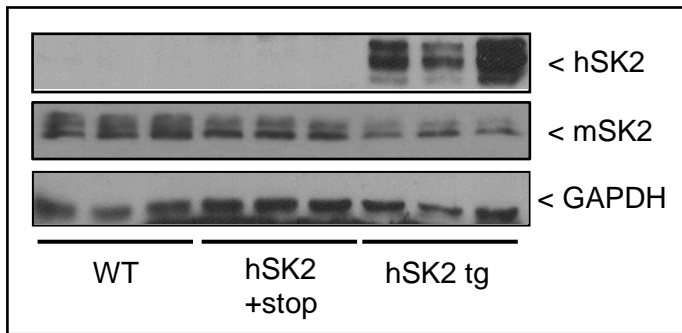


Abb. 26: Proteinexpression der SK2 in Nierenlysaten
Nierenlysate (jeweils 50 µg) von Wildtyp-, hSK2 +stop und hSK2 tg Mäusen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und mittels Western Blot Analysen untersucht. Es wurde die Expression der humanen und murinen SK2 bei 68 kDa analysiert, sowie von GAPDH bei 36 kDa als Ladekontrolle.

A



B

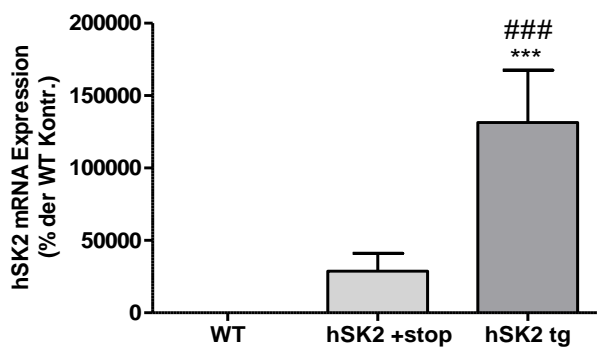


Abb. 27: Expression der SK2 in Maus-Mesangiumzellen

Mit den Zelllysaten der Mesangiumzellen der Wildtyp-Mäuse, hSK2 +stop und hSK2 tg Mäuse wurde mit 20 µg Protein ein Western Blot (A) durchgeführt zur Analyse von humaner und muriner SK2 bei 68 kDa und von GAPDH bei 36 kDa als Ladekontrolle. Mit Hilfe der Real-Time-PCR (B) konnten die mRNA-Expressionsspiegel der hSK2 in WT, hSK2 +stop und hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen ermittelt werden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt und die Analyse erfolgte über 1way ANOVA und Bonferroni-Post-Test (n=3). ***p<0,001 wurde als statistisch signifikant gegen die WT Maus-Mesangiumzellen angesehen, ###p<0,001 wurde als statistisch signifikant gegen die hSK2 +stop Maus-Mesangiumzellen angesehen.

In Abb. 28 wurde die Lokalisation der SK2 untersucht. Dazu wurden mittels eines Kernprotein-Extraktionskits die Zellkerne von der restlichen Zellfraktion (Zytosol und andere Membranfraktionen) getrennt (2.6.4). Über die Methode des Western Blots (2.6.6) konnte die SK2 in den Zellkompartimenten sichtbar gemacht werden. Dabei war deutlich zu sehen, dass die humane SK2 in den hSK2 tg Lysaten vermehrt im Zytosol lokalisiert ist. Auch die Expression der murinen SK2 war vermehrt im Zytosol lokalisiert in den hSK2 +stop und in den hSK2 tg Lysaten. Lamin B und HuR sind dabei Marker für Kernproteine, wohingegen GAPDH als Marker für zytosolische Proteine dient.

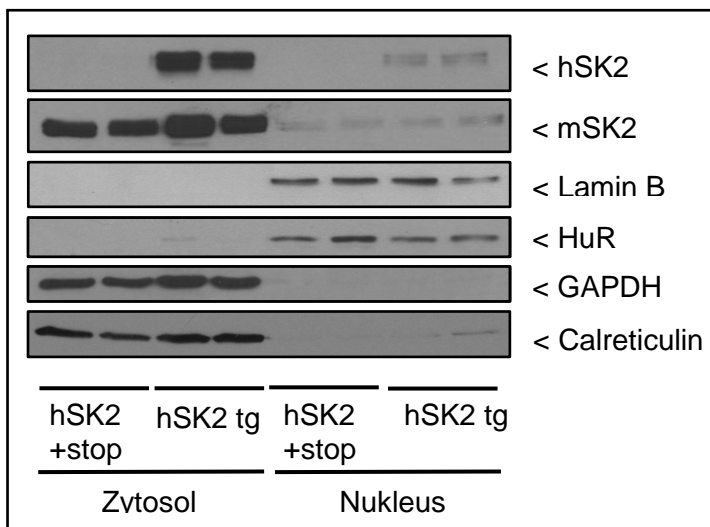


Abb. 28: Lokalisation der SK2

Durch eine Extraktion der Zellkerne und des Zytosols der hSK2 +stop und hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen ist eine Bestimmung der Lokalisation der SK2 (68 kDa) möglich. Dazu wurden 20 µg Protein für eine Western Blot Analyse verwendet und die Expression humaner und muriner SK2 untersucht. Lamin B (68 kDa) und HuR (30 kDa) sind Marker für Zellkernproteine, wohingegen GAPDH (36 kDa) ein zytosolisches Protein darstellt. Calreticulin (55 kDa) wurde als ER Marker verwendet.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die im Zytosol überexprimierte transgene SK2 auch aktiv ist. Dazu wurde ein SK2-Aktivitätsassay durchgeführt wie unter 2.2.1 beschrieben. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Überexpression der humanen SK2 auch aktiv war. Da vor dem SK2-Aktivitätsassay noch eine Kern-Proteinextraktion (2.6.4) durchgeführt wurde, konnte bestätigt werden, dass die überexprimierte, humane SK2 signifikant nicht im Kern, sondern in der restlichen Zellfraktion lokalisiert und dort auch aktiv war (Abb. 29).

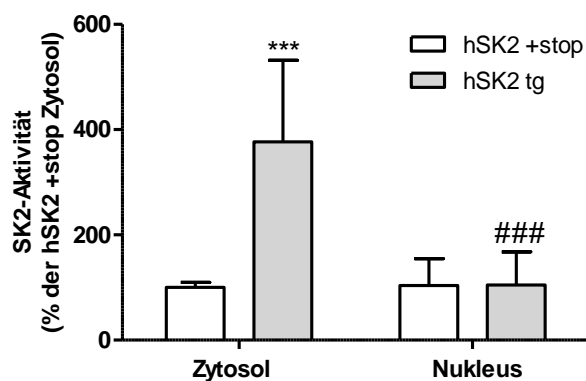


Abb. 29: Aktivität der SK2 in Zytosol und Kern von hSK2 +stop und hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen
Um die Enzymaktivität der SK2 in den hSK2 +stop und hSK2 tg Mesangiumzellen zu untersuchen, wurde nach einer Extraktion der Kerne und des Zytosols eine Aktivitätsmessung durchgeführt. Dazu wurden 10 µg Protein der Kern- und Zytosol-Extrakte für die Aktivitätsmessung der SK2 verwendet. Die Aktivitätsdaten sind als % der Kontrollzellen im Zytosol dargestellt und zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung (n=3). Die Analyse erfolgte über 1way ANOVA und Bonferroni-Post-Test. ***p<0,001 statistisch signifikant zu Zytosol der hSK2 +stop Lysate, ###p<0,001 statistisch signifikant zu Zytosol der hSK2 tg Lysate.

3.2.2. Sphingolipidzusammensetzung in den Maus-Mesangiumzellen

Zur Bestimmung der Sphingolipid-Metabolite wurde die LC-MS/MS-Analyse (2.7.1) verwendet. Um die Lipid-Zusammensetzung noch detaillierter zu analysieren, wurde die LC-MS/MS-Methode nach vorangegangener Kernprotein-Extraktion (2.6.4) durchgeführt. Dabei war zu beachten, dass die zytosolische Fraktion auch subzelluläre Organellen wie beispielsweise das ER enthält. Dies wurde in Abb. 28 durch Calreticulin bestätigt.

Die hSK2 tg Zellen wiesen erhöhte S1P-Spiegel auf in der zytosolischen Fraktion. Diese waren weiter erhöht in der Kernfraktion der hSK2 tg Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Sphingosin-Spiegel stiegen in den hSK2 tg Zellen ebenfalls deutlich an in der Kernfraktion, wobei die Ceramid-Spiegel keine Unterschiede zwischen den hSK2 tg Zellen und den Kontrollzellen aufwiesen (Abb.30).

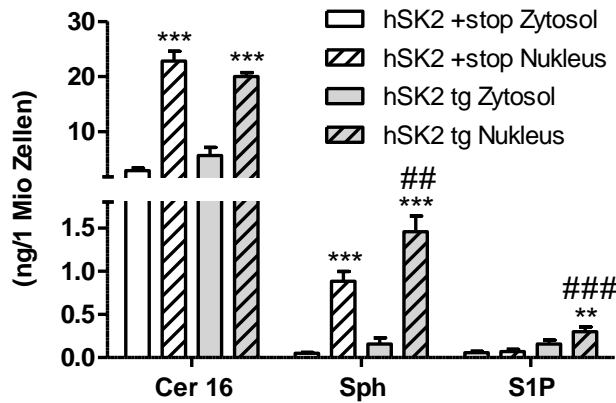


Abb. 30: Sphingolipidzusammensetzung der Maus-Mesangiumzellen in Zytosol und Kern
 Nach einer Kernprotein-Extraktion konnte mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode die Sphingolipid-Zusammensetzung im jeweiligen Zytosol und Kern der hSK2 +stop und hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen analysiert werden. Die Ergebnisse wurden als ng/1 Millionen Zellen dargestellt und zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung (n=3). Die Analyse erfolgte über 1way ANOVA und Bonferroni-Post-Test. **p<0,01, ***p<0,001 wurden als statistisch signifikant gegen das jeweilige Zytosol und ##p<0,01, ###p<0,001 wurde als statistisch signifikant gegen hSK2 +stop Nukleus angesehen.

3.2.3. Expression der S1P-Rezeptoren

Wie unter 1.4.1 beschrieben spielen die S1P-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei den durch S1P ausgelösten Zellantworten. Da bei der Analyse der Sphingolipid-Metabolite ein erhöhter Spiegel an S1P beobachtet werden konnte, sollten folglich seine Rezeptoren untersucht werden. In Abb. 31 ist die mRNA-Expression der fünf S1P-Rezeptorsubtypen in den hSK2 +stop und den hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen dargestellt. In den hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen war die mRNA Expression des S1P₁-Rezeptors auf mRNA-Ebene signifikant verringert im Vergleich zu den hSK2 +stop Zellen. Die Rezeptoren S1P₂₋₅ wiesen in ihrer mRNA-Expression keine signifikanten Unterschiede auf.

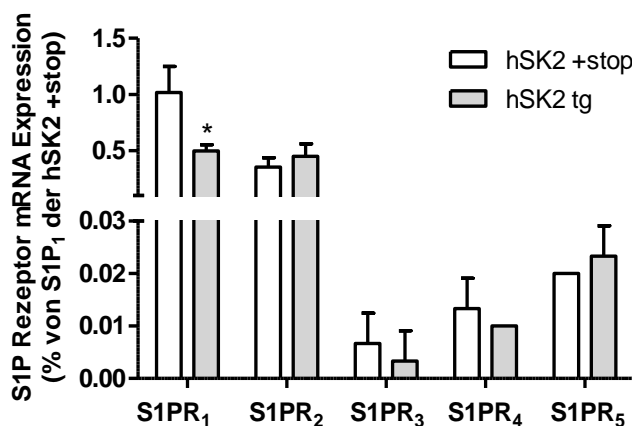


Abb. 31: Expression der S1P-Rezeptoren

Mit Hilfe der Real-Time-PCR konnten die mRNA-Expressionslevel der S1P-Rezeptoren der hSK2 +stop und hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen ermittelt werden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung in % des S1P₁-Rezeptor der hSK2 +stop Maus-Mesangiumzellen dargestellt (n=3). Die Statistik wurde mittels 1way ANOVA und Bonferroni-Post-Test bestimmt. *p<0,05 wurden als statistisch signifikant gegen den jeweiligen S1P-Rezeptor der hSK2 +stop Maus-Mesangiumzellen angesehen.

3.2.4. Nachweis der Proliferation

Zum Nachweis der Proliferation wurde der [³H]-Thymidineinbau in neu synthetisierte DNA bestimmt, wie unter 2.6.2 beschrieben. Es wurden dazu Wildtypzellen, hSK2 +stop und hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen verwendet. Der Zeitpunkt nach 5 Stunden wurde als Vergleichswert angesehen. Wie in Abb. 32 graphisch dargestellt, stieg die Proliferationsrate der Wildtypzellen und der hSK2 +stop Zellen nach 72 Stunden um ein Vielfaches an. In hSK2 tg Mesangiumzellen war die Proliferation dagegen stark reduziert.

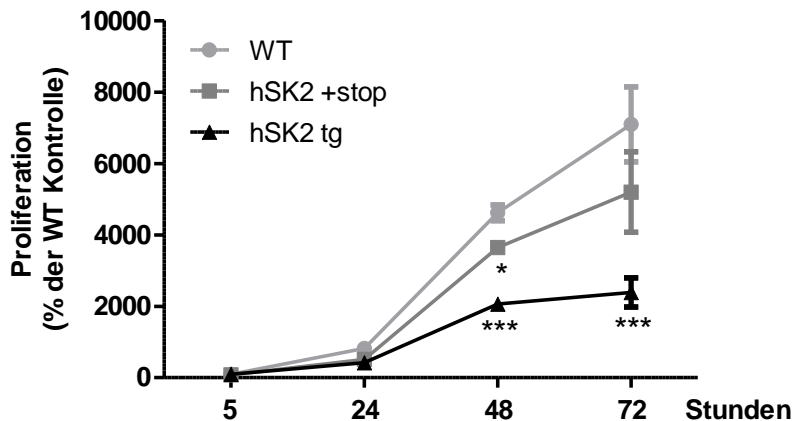


Abb. 32: Proliferation der Maus-Mesangiumzellen

Zur Bestimmung der Proliferation der Mesangiumzellen wurden 20.000 Zellen pro 0,5 mL mit 0,2 μ Ci/mL [³H]-Methyl-Thymidin versetzt und für 5, 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Aufarbeitung und Messung erfolgt wie unter 2.6.2 beschrieben. Die Proliferationsrate wurde als Mittelwert in % der Wildtypzellen (WT) nach 5 Stunden angegeben und sind mit Standardabweichung dargestellt (n=4). Die Statistik wurde mittels 1way ANOVA und Bonferroni-Post-Test bestimmt. *p< 0,05, ***p<0,001 wurden als statistisch signifikant auf den jeweiligen Wildtypwert angesehen.

3.2.5. ERK und Akt Phosphorylierung

Zur Überprüfung des Phosphorylierungsstatus von ERK und Akt wurde eine SDS-PAGE mit nachfolgender Western Blot Analyse wie unter 2.6.5 und 2.6.6 beschrieben durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in den hSK2 tg Mesangiumzellen sowohl die phosphorylierte ERK (A) als auch das phosphorylierte Akt (B) im Vergleich zu den Kontrollen hSK2 +stop signifikant um die Hälfte verringert war.

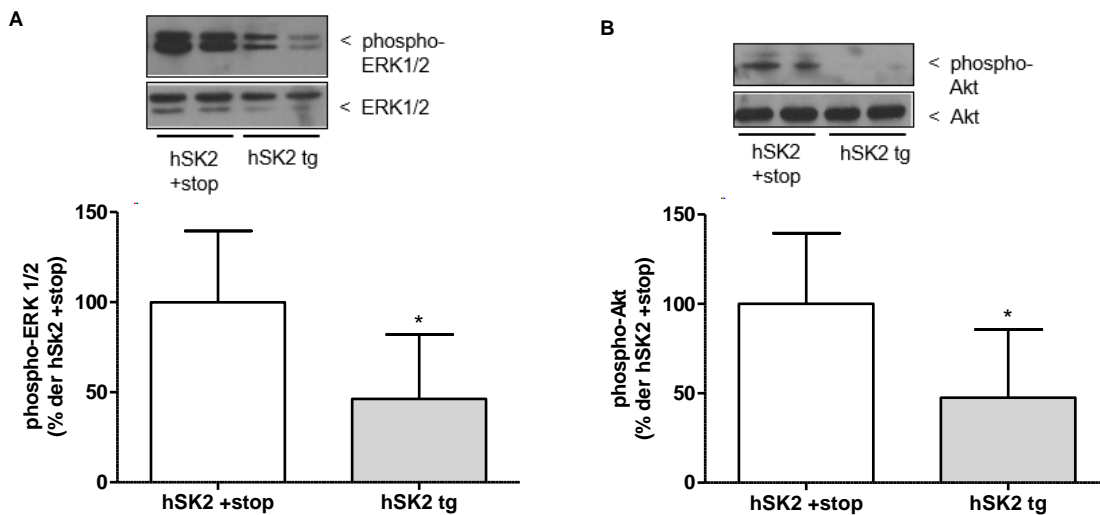


Abb. 33: Phosphorylierungsstatus von ERK und Akt

Zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von ERK (42,44 kDa) (A) und Akt (60 kDa) (B) wurden 20 µg Proteinlysate der Mesangiumzellen mittels Western Blot (2.6.6) analysiert. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt und wurden auf die Kontrollen hSK2 +stop bezogen (n=3). Die Statistik wurde mittels T-Test bestimmt. *p<0,05 ist statistisch signifikant gegen die Kontrolle hSK2 +stop

3.2.6. Apoptose in Maus-Mesangiumzellen

Um den Vorgang der Apoptose in den Maus-Mesangiumzellen zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden durchgeführt. In einem DNA-Fragmentierungs-ELISA (siehe 2.2.3) werden Doppelstrangbrüche bestimmt. Die Ergebnisse dieses ELISA sind in Abb. 34 zusammengefasst. Durch eine Behandlung der Zellen mit Staurosporin, einem klassischen Induktor von Apoptose, wurde untersucht, ob hSK2 tg Zellen und Kontrollzellen unterschiedlich empfindlich auf Apoptose reagieren. In dem Graphen lässt sich deutlich eine signifikante Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli der hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen erkennen. Eine ähnliche Sensibilisierung kann auch durch die Apoptose-Stimuli TNFα/CHX und LPS/CHX erreicht werden (Abb. 34).

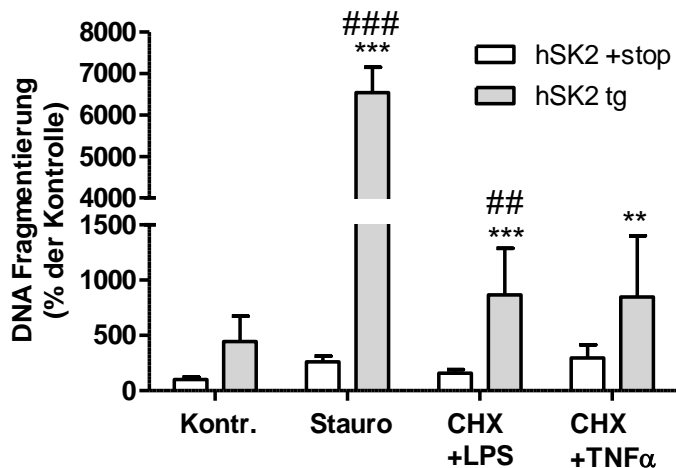


Abb. 34: Wirkung von hSK2 Überexpression auf die DNA-Fragmentierung von Maus-Mesangiumzellen. Kontrollzellen und hSK2 tg Zellen wurden für 6 Stunden mit 10 nM Staurosporin, TNF α /CHX (TNF α 2nM, CHX 10 μ M) und LPS/CHX (LPS 100 ng/mL, CHX 10 μ M) für 6 Stunden stimuliert. Anschließend wurde der DNA-Fragmentierungs-ELISA nach Herstellerangaben wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Es ist der Einfluss der hSK2 Überexpression auf die DNA-Fragmentierung dargestellt. Die Daten sind als % DNA-Fragmentierung bezogen auf die unstimulierte Kontrolle hSK2 +stop angegeben und zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung (n=2-3). Die Statistik wurde mittels 1way ANOVA und Bonferroni-Post-Test bestimmt. **p<0,01, ***p<0,001 wurden als statistisch signifikant auf die unstimulierte Kontrolle hSK2 +stop bezogen, ##p<0,01, ###p<0,001 wurde als statistisch signifikant auf die unstimulierten hSK2 tg Mesangiumzellen bezogen.

Um diese Resultate auch auf molekularer Ebene zu untermauern, wurde einige wichtige pro- und anti-apoptotische Proteinen untersucht. Bcl-xL ist als pro-apoptotisches Protein durch die Überexpression der hSK2 nicht verändert. Bcl-xL erscheint im Western Blot als Doppelbande, durch die Desaminierung der beiden Aminosäuren Asn⁵² und Asn⁶⁵ zu Asp. Allerdings ist nur die obere Bande, die die doppelte Desaminierung von Asn⁵² and Asn⁶⁵ darstellt, funktionell charakterisiert (Beaumat et al. 2016). In Mesangiumzellen führte die Stimulation mit Staurosporin zu der zuvor genannten Desaminierung. Weiterhin führte Staurosporin wie bereits beschrieben von Giuliano et al. 2004 zu einer Reduktion des Proteins Bcl-xL. In den hSK2 tg Zellen reduzierte Staurosporin den Bcl-xL Spiegel vermehrt (Abb. 35).

Apoptose kann wie bereits beschrieben durch hauptsächlich zwei Signalwege vermittelt werden, den extrinsisch, Rezeptor-vermittelten oder den intrinsischen Signalweg mit Beteiligung der Mitochondrien (1.1.3). Beide Signalwege führen zur Aktivierung der Effektorcaspase-3. Es sollte untersucht werden, ob der intrinsische Signalweg mittels Apoptosom-Bildung und Aktivierung der Initiatorcaspase-9 involviert ist. In hSK2 tg Zellen konnte bereits eine basal erhöhte Spaltung und Aktivierung der Caspase-9 im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden. Staurosporin konnte diesen Effekt verstärken, wobei die Spaltung der Caspase-9 in den hSK2 tg Zellen vermehrt induziert wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen.

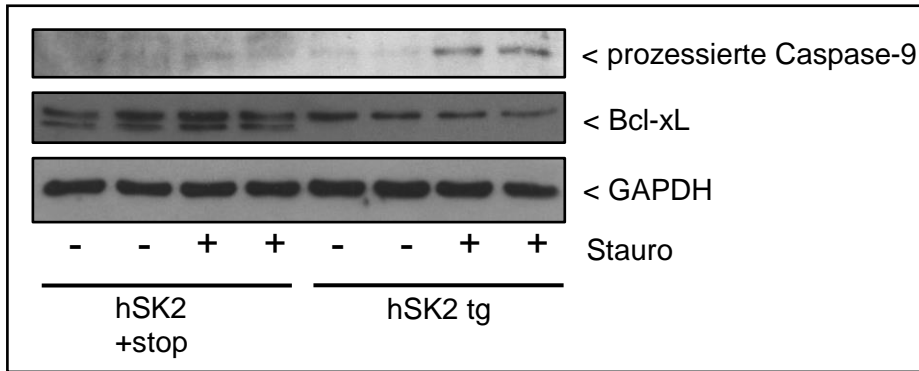


Abb. 35: Prozessierung der Caspase-9 und Expression von Bcl-xL

Um Bcl-xL (30 kDa) und das Spaltprodukt der Caspase-9 (37 kDa) zu untersuchen, wurden die Maus-Mesangiumzellen für 6 Stunden mit 10 nM Staurosporin stimuliert. Für die Western Blot Analyse (2.6.6) wurden 20 µg Protein verwendet und GAPDH (36 kDa) dient als Ladekontrolle.

Die Analyse der Spaltung der Caspase-3 konnte die bisherigen Ergebnisse bestätigen (Abb. 36). In den Kontroll-Zelllysaten ohne Staurosporin-Stimulation sind jeweils keine Spaltprodukte der Caspase-3 sichtbar. Durch Stimulation mit Staurosporin wird die Caspase-3 gespalten und die Spaltprodukte sichtbar. Dabei ist zu erkennen, dass in den hSK2 tg Lysaten eine vermehrte Spaltung der Caspase-3 vorhanden war im Vergleich zu den hSK2 +stop Lysaten.

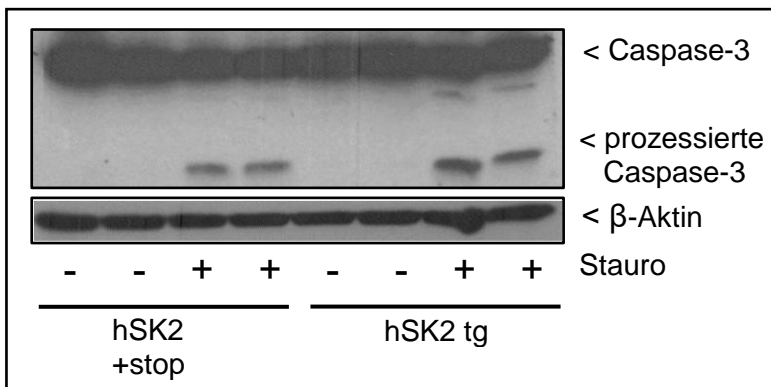


Abb. 36: Prozessierung der Caspase-3

Die Mesangiumzellen wurden mit 10 nM Staurosporin für 6 Stunden inkubiert und das Spaltprodukt der Caspase-3 (17 kDa) untersucht. Es wurden 20 µg Protein für die Western Blot Analyse (2.6.6) verwendet. β-Aktin (42 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Expression von PARP ist in Abb. 37 dargestellt. Durch die Stimulation des Apoptosesignalweges mittels Staurosporin wird die Spaltung von PARP induziert. Diese war in den hSK2 tg Mesangiumzellen deutlich erhöht gegen die mit Staurosporin inkubierten Kontrollzellen hSK2 +stop.

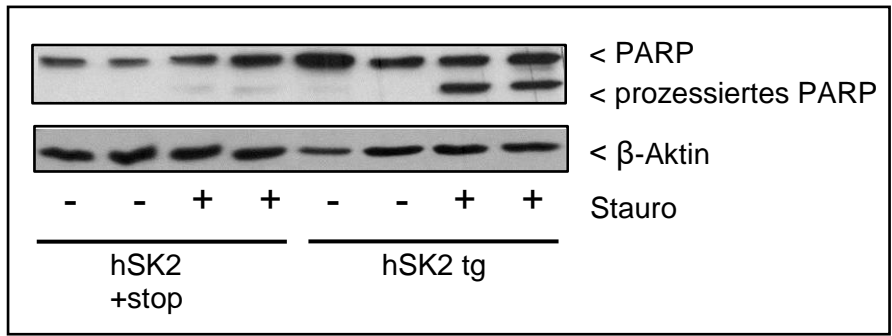


Abb. 37: Prozessierung von PARP

Für die Untersuchung des Spaltprodukts von PARP wurden 20 µg Protein aus den jeweiligen Zelllysaten der hSK2 +stop und der hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen für die Western Blot Analyse (2.6.6) verwendet. Die Maus-Mesangiumzellen wurden zuvor für 6 Stunden mit 10 nM Staurosporin inkubiert. β-Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle.

4. Diskussion

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Protein-Expression der SK2 nach UUO in der Maus hochreguliert ist und dies mit einer ebenfalls erhöhten Aktivität des Enzyms einherging. Die genetische Deletion der SK2 in der Maus führte zu einem protektiven Effekt im UUO-Nierenfibrose-Modell auf. Diese Befunde sind neu, da bisher lediglich die SK1 untersucht worden war. Auch die SK1 zeigte eine gesteigerte renale Expression in Patienten mit diabetischer Nephropathie, in durch Albuminurie verursachter Nephropathie und bei polyzystischen Nierenerkrankungen (Natoli et al. 2012; Ren et al. 2009; Xu et al. 2014). Die SK2 war dabei nicht analysiert worden oder wies nur geringe Veränderungen der mRNA-Expression auf (Bajwa et al. 2017). Um bessere Informationen zur Protein-Expression der SK2 zu erhalten, hatten wir zwei polyklonale Anti-Peptid-Antikörper gegen SK2 im Kaninchen generiert, die sich als Spezies-spezifisch erwiesen und einerseits ausschließlich die humane SK2 (Antikörper Nummer 66), andererseits das Ratten- und Mausenzym (Antikörper Nummer 26) erkannten. Im humanen Material konnten wir hier eine distaltubuläre Lokalisation der SK2 in histologischen Schnitten einer gesunden Niere nachweisen. Zusätzlich konnte im UUO-Mausmodell erstmals die Hochregulation der mSK2 auf Proteinebene gezeigt werden. Interessanterweise wurde die SK2 jedoch nicht auf mRNA-Ebene hochreguliert, was vermuten lässt, dass der Mechanismus der SK2 Protein-Hochregulation nicht über eine vermehrte Gentranskription verläuft. Möglicherweise ist eine veränderte Proteinstabilität der SK2 involviert oder durch die Folgen der UUO könnte es durch infiltrierende Immunzellen zu erhöhten SK2-Expressionsspiegeln kommen. Um die mechanistischen Hintergründe der vermehrten SK2-Expression durch UUO zu klären, wären weitere Experimente notwendig. In jedem Fall zeigen diese Ergebnisse eine wichtige Rolle der SK2 bei tubulärer Fibrose auf.

Die hier gezeigten Ergebnisse hinsichtlich der verminderten Fibroseentwicklung unter SK2-Deletion (3.1 und Schwalm et al. 2017) passen zu den Studien von Bajwa et al. 2017 und Ghosh et al. 2018, die in ähnlichen Nierenfibrosemodellen vergleichbare Befunde erhielten, jedoch andere Mechanismen postulierten. In meiner Arbeit wurde eine vermehrte Smad7-Expression durch erhöhte Sphingosin-Spiegel beobachtet, die die Fibroseentwicklung verminderte. Bei Bajwa et al. 2017 wurde der der Schutzwirkung zugrunde liegende Mechanismus einer erhöhten Interferon- γ -Produktion zugeschrieben. Interferon- γ als pro-inflammatorisches Zytokin zeigt bekanntermaßen ebenfalls anti-fibrotische Wirkungen durch eine Reduktion der Myofibroblasten-Aktivierung und einer daraus folgenden Extrazellulärmatrix-Deposition (Xu et al. 2014; Oldroyd et al. 1999). Ghosh et al. 2018 zeigte eine verminderte renale Entzündung und Fibroseentwicklung mit Mäusen einer SK2-Deletion, sowie mit einer Behandlung des SK2-Hemmers SLP 120701 nach UUO. Diese ist laut Ghosh et al. 2018 auf eine vermehrte M2-Makrophagen-Polarisierung zurückzuführen, da die SK2 eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung der Makrophagen spielt. In der vorliegenden

Arbeit wurde eine verminderte Makrophagen-Infiltration in den SK2^{-/-}-Mäusen nach UUO beobachtet. Ob diese Makrophagen dem M2-Phänotyp entsprechen, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden

Der von uns postulierte Mechanismus der Schutzwirkung unter SK2 Deletion beinhaltet die Hochregulation von Smad7. Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von Smad7 in den SK2^{-/-}-Mäusen signifikant erhöht war und durch UUO weiter anstieg. Smad7 ist ein inhibitorischer Faktor des TGFβ/Smad-Signalweges und spielt eine wichtige inhibitorische Rolle bei der Entstehung fibrotischer Nierenerkrankungen. Bereits basal wiesen die SK2^{-/-}-Mäuse erhöhte Spiegel an Smad7 auf, die durch das UUO-Model noch weiter anstiegen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von Smad7 die Nierenfibrose verbessert, während eine Inhibition von Smad7 die Fibrose weiter verstärkt (Chung et al. 2009; Meng et al. 2015).

Wie bereits erwähnt konkurriert Smad7 mit den R-Smads um die Bindung an den aktivierten TGFβ-Rezeptoren und wirkt somit inhibitorisch auf den Smad-Signalweg (Meng et al. 2015; Lan 2011). Smad7 bindet an den Typ I TGFβ-Rezeptor und rekrutiert eine Serin/Threonin-Protein-Phosphatase, die eine Dephosphorylierung und somit Inaktivierung des Rezeptors bewirkt (Shi et al. 2004). Weiterhin führt die Rezeptorbindung von Smad7 zur Rekrutierung der E3 Ligase Smurf2, die den Abbau des Rezeptors durch Endozytose herbeiführt (Di Guglielmo et al. 2003; Kavsak et al. 2000). Ein weiterer Angriffspunkt von Smad7 zur Hemmung des TGFβ-Signalweges ist die Smad-Komplexbildung im Kern (Zhang et al. 2007). Aus diesen Gründen kann die vermehrte Smad7 Expression in den SK2^{-/-}-Mäusen sowohl die verminderte Aktivierung respektive Phosphorylierung von Smad2 und 3 erklären, als auch die geringere Fibrose im UUO-Modell. Dies wurde zusätzlich bekräftigt durch unsere Befunde an den hSK2 transgenen Mäusen, die eine verstärkte Fibroseentwicklung und eine geringere Smad7-Expression aufwiesen.

Interessanterweise wurde auch von anderen berichtet, dass es einen Zusammenhang zwischen Interferon-γ und Smad7 gibt. So konnte gezeigt werden, dass Interferon-γ Smad7 hochreguliert und über diesen Mechanismus antifibrotisch wirkt (Ulloa et al. 1999; Weng et al. 2007). Da in den Kontrollnieren, sowie in den primären Nierenfibroblasten und den siSK2-transfizierten Zellen ebenfalls eine Hochregulation der Smad7-Expression ohne Interferon-γ-produzierende Zellen zu beobachten war, muss der Grund für die vermehrte Smad7-Expression in SK2^{-/-}-UUO-Mäusen weiter untersucht werden.

In der Literatur wurde eine erhöhte Smad7-Expression als anti-inflammatorische Gegenregulation in Mäusen mit latenter Überexpression von TGFβ beschrieben. Diese Mäuse wiesen zusätzlich eine geringere F4/80-positive Makrophagen-Infiltration nach einer Ureterobstruktion auf (Wang et al. 2005). Diese Beobachtung passt zu den bereits beschriebenen Ergebnissen der SK2^{-/-}-UUO-Mäuse, die ebenfalls eine verminderte Infiltration

F4/80-positiver Makrophagen aufweisen. Bereits Wang et al. 2005 konnten mechanistisch zeigen, dass eine vermehrte Expression von I κ B α die inflammatorische NF- κ B-Aktivierung unterdrücken kann. Im Gegensatz dazu entwickeln Smad7 deletierte Mäuse eine schwerere Fibrose mit vermehrter Makrophagen-Infiltration und NF- κ B-Aktivierung (Chung et al. 2009). In wie weit Smad7 in die kontrovers diskutierte Rolle der Sphingosinkinasen und S1P in der NF- κ B-Aktivierung und inflammatorische Antwort hineinspielt (Aoki et al. 2016), muss weiter untersucht werden.

Um den Einfluss der SK2-Defizienz weiter zu untersuchen, wurde eine Lipid-Analyse mittels Massenspektrometrie (2.7) durchgeführt. In diesem Zusammenhang konnten erhöhte Sphingosin-Spiegel in Plasma und Nierengewebe der SK2^{-/-}-Mäuse nach UUO festgestellt werden, sowie eine verminderte S1P-Produktion. Um die Zusammenhänge zwischen einer potentiellen anti-fibrotischen Wirkung von vermehrtem Sphingosin und Smad7 genauer zu untersuchen wurden primäre Nierenfibroblasten aus Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen verwendet. Durch die Zugabe von Sphingosin in Gegenwart eines SK-Hemmers, um eine rasche Metabolisierung von Sphingosin zu unterbinden, konnten die CTGF- und PAI-1-Expression sowohl in den Wildtyp- als auch den SK2^{-/-}-Fibroblasten vermindert werden. Die Smad7-Expression erhöhte sich bereits durch die alleinige Zugabe von Sphingosin. Die Bestätigung dieser Ergebnisse erfolgte mittels *in vitro* Sirius Red Assay. Die durch Sirius Red detektierte Kollagen-Bildung in den Wildtyp-Fibroblasten konnte durch die Zugabe von Sphingosin und des SK-Hemmers nach TGF β -Stimulation auf das Niveau der SK2^{-/-}-Fibroblasten gebracht werden. Auf welche Weise Sphingosin dabei die Smad7-Expression induziert und ob andere anti-fibrotischen Effekte dazu beitragen die Folgen des UUO-Modells in den SK2^{-/-}-Mäusen zu vermindern bleibt dabei offen. Bekannt ist bisher, dass die Smad7-Expression hauptsächlich über Proteinstabilität reguliert wird. Der Abbau erfolgt über Ubiquitinierung mit folgendem proteosomalen Abbau (Izzi und Attisano 2004). In diesem Zusammenhang konnten Haberkant et al. mittels eines photoaktivierbaren und klickbaren Sphingosin-Analogons verschiedene Ubiquitin E3 Ligasen als Bindungspartner für Sphingosin identifiziert. Diese Ubiquitin E3 Ligasen könnten auch die Proteinstabilität von Smad7 regulieren (Haberkant et al. 2016). Eine mögliche, direkte Interaktion zwischen Sphingosin und Smad7 muss in Zukunft noch untersucht werden. Bisher gibt es keine weiteren Studien, die den Einfluss von Sphingosin auf die Entstehung von Fibrose untersucht hätten. Es ist bekannt, dass Sphingosin verschiedene Signalkaskaden beeinflusst. Dazu zählen die Proteinkinase C, Calmodulin-abhängige Kinasen und 14-3-3-Proteine (Hannun und Bell 1989; Jefferson und Schulman 1988; Woodcock et al. 2010). Ob einer dieser Signalwege in den antifibrotischen Effekt von Sphingosin mit hinein spielt bleibt zu klären. Außerdem könnten andere Sphingolipid-Spezies zum anti-fibrotischen Nieren-Phänotyp der SK2^{-/-}-Mäuse beitragen.

Zwischen den Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen ließ sich nach UJO kein signifikanter Unterschied in den S1P-Spiegeln feststellen. Allerdings wiesen die SK2^{-/-}-Mäuse bereits unter Kontrollbedingungen erhöhte S1P-Spiegel im Plasma auf. Die erhöhten S1P-Spiegel im Plasma der SK2^{-/-}-Mäuse wurden bereits in anderen Arbeiten beschrieben und eine Rolle der SK2 bei der Senkung der S1P-Spiegel wird angenommen (Kharel et al. 2015; Sensken et al. 2010; Kharel et al. 2012). So könnte die SK2 beispielsweise die S1P-Lyase oder Phosphatasen aktivieren. Des Weiteren könnte eine kompensatorische, überschießende Aktivität der SK1 in Folge der SK2-Deletion zu erhöhten S1P-Spiegeln führen (Kharel et al. 2012). Ein genauer Mechanismus für diese Beobachtung bleibt aber unklar. Die erhöhten S1P-Spiegel könnten zum Schutz der Niere gegen das UJO-Modell beitragen, da das S1P über den S1P₁-Rezeptor eine wichtige Barrierefunktion aktiviert. Dieser protektive Effekt konnte bereits in Modellen eines akuten Nierenschadens und der diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden (Bajwa et al. 2010; Awad et al. 2011; Ham et al. 2014). Im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten konnte nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere eine erhöhte Schadensausprägung mit vermehrtem Zelltod und erhöhter Infiltration von Neutrophilen in SK2^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden. Bei dieser Studie zeigte sich, dass die SK2 unerlässlich für die protektive Wirkung des FTY720 ist (Jo et al. 2009). FTY720 vermindert die Entwicklung einer Nierenfibrose nach dem UJO-Modell durch verminderte Myofibroblasten-Akkumulation und verminderte Infiltration von inflammatorischen Zellen. Die Eindämmung der Fibroseentwicklung geschieht vermutlich über die Hemmung des extrazellulären S1P-Signalweges (Thangada et al. 2014; Shiohira et al. 2013). Weiterhin konnte eine antifibrotische Wirkung von Ceramid nachgewiesen werden, indem es die CTGF-Expression reduziert (Kennedy et al. 2008; Sonoda et al. 2014). So lässt sich annehmen, dass Sphingosin und eventuell Ceramid zum protektiven Effekt in SK2^{-/-}-Mäusen beitragen. Da diese Metabolite leicht ineinander überführbar sind, könnten die entsprechenden Enzyme, nämlich die Sphingomyelinasen, Ceramidsynthasen und Ceramidasen, durchaus ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung der Fibrose spielen. So wurde in einem Bleomycin-induzierten Lungenfibrose-Modell in der Maus eine erhöhte Expression der sauren Ceramidase beschrieben (Dhami et al. 2010). Im Gegensatz dazu zeigten Patienten und Mäuse mit zystischer Fibrose eine verringerte Aktivität der sauren Ceramidase in Trachea und den Bronchien, was zu einem geringeren Sphingosin-Spiegel und einer erhöhten Anfälligkeit für *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen führte.

Ein weiterer, denkbarer Mechanismus, der zur Verminderung der Fibroseentwicklung in SK2-defizienten Mäusen führen könnte, wäre ein Schutz gegen den apoptotischen Stress der tubulären Zellen oder ein verbesserter Reparaturmechanismus der tubulären Zellen nach der Induktion der UJO (Docherty et al. 2006; Venkatachalam et al. 2010). Da in dieser Arbeit allerdings kein Unterschied zwischen Wildtyp- und SK2^{-/-}-UJO-Mäusen in der Quantifizierung

des tubulären Schadens festgestellt werden konnte, kann dieser Mechanismus ausgeschlossen werden.

Um die SK2 hinsichtlich Nierenerkrankungen weiter zu charakterisieren, wurden für diese Arbeit ebenfalls Maus-Mesangiumzellen aus den Glomerula der Maus-Nieren gewonnen. Dazu wurde ein transgener Mausstamm verwendet, der eine systemische Überexpression der humanen SK2 aufweist. Mesangiumzellen, die aus den Nieren der hSK2 tg-Mäuse isoliert wurden, zeigten einen anti-proliferativen Phänotyp. Diese Zellen wuchsen langsamer in Kultur und reagierten sensitiver auf Stress-induzierte Apoptose. Bereits zuvor konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Deletion der SK2 in den Mesangiumzellen zu vermehrter Proliferation, sowie zu einem Schutz gegenüber Apoptose-Stimuli führt (Schwalm et al. 2015; Hofmann et al. 2008).

Die hier gezeigten Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der Arbeit von Spiegel und ihren Mitarbeitern zu sehen, die zeigten, dass die SK2 eine BH3-Bindedomäne aufweist (Liu et al. 2003). Diese Bindedomäne interagiert mit dem anti-apoptotischen Faktor Bcl-xL und hemmt diesen, wodurch Apoptose induziert wird. Durch Mutation der BH3-Bindedomäne konnte der pro-apoptotische Effekt aufgehoben werden (Liu et al. 2003). Liu et al. 2003 wiesen weiterhin nach, dass die Induktion der Apoptose durch die SK2 unabhängig von S1P-Rezeptoren stattfindet. Da in den hSK2 tg Maus-Mesangiumzellen erhöhte S1P-Spiegel zu messen waren, sollten die Expressionsraten der Rezeptoren auf mRNA-Ebene untersucht werden. Die Ergebnisse von Liu et al. 2003 konnten auch insofern bestätigt werden, da eine S1P-vermittelte, extrazelluläre Zellantwort ausgeschlossen werden konnte.

Weiterhin passen die hier gezeigten Ergebnisse zu den Arbeiten von Igarashi et al. 2003 und Okada et al. 2005, die anti-proliferative Effekte durch die Überexpression der SK2 nachweisen konnten. Allerdings wurden auch gegensätzliche Ergebnisse gezeigt und die beispielsweise eine gesteigerte Proliferation durch die SK2 beschrieben (Neubauer et al. 2016; French et al. 2010). Viele dieser Studien wurden mittels des SK2-Hemmers ABC294640 durchgeführt. ABC294640 wurde als selektiver und spezifischer SK2-Hemmer beschrieben, der bei der *in vitro* Charakterisierung einen IC₅₀-Wert von 60 µM aufzeigte (French et al. 2010). Es wurde beschrieben, dass ABC294640 S1P-Spiegel im Plasma reduziert, sowie die S1P-Spiegel in Tumoren von Xenograft Modellen senkt (Beljanski et al. 2011). Mit Hilfe des Hemmers konnte in verschiedenen Tumor-Xenograft-Modellen eine Verminderung der Tumormasse erreicht werden (Beljanski et al. 2011; Antoon et al. 2010; Chumanevich et al. 2010; French et al. 2010). Dabei müssen unspezifische Nebenwirkungen an anderen Zielproteinen bedacht werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ABC294640 den Östrogen-Rezeptor direkt blockieren kann. Dies wäre eine Erklärung, warum Östrogen-abhängige Brustkrebszellen, wie MCF7, so sensitiv auf ABC294640 reagieren (Antoon et al. 2010). Weiterhin bewirkte ABC294640 in SK2^{-/-}-Zellen eine ebenso reduzierte DNA-Synthese wie in

Wildtyp-Zellen, was klar auf einen SK2-unabhängigen Effekt schließen lässt (Schwalm et al. 2015). Trotz dieser Nebeneffekte von ABC294640 wurde der Hemmer in eine klinische Phase I Studie bei soliden Tumoren aufgenommen (Britten et al. 2017).

Es wurden weitere SK2-Hemmer entwickelt wie K145 (Liu et al. 2013) und die Pyrrolidylguanidin-Verbindungen SLC5111312 und SLM6081442 (Kharel et al. 2015). Das Besondere der beiden Pyrrolidylguanidin-Verbindungen ist, dass die Gabe bei Mäusen einen Anstieg der S1P-Werte im Plasma verursacht. Dieser Effekt ist ebenfalls bei den SK2^{-/-}-Mäusen zu beobachten und wurde wie oben beschrieben über einen gestörten S1P-Abbau erklärt (Zemann et al. 2006; Kharel et al. 2015). Somit geht die Suche nach einem spezifischen SK2-Hemmer weiter, da dieser vor allem in renalen Erkrankungen einen wichtigen, therapeutischen Ansatz bilden könnte.

Um diese gegensätzlichen Ergebnisse über die SK2 hinsichtlich Proliferation und Apoptose erklären zu können, postulierten Neubauer et al. 2016, dass es eine Rolle zu spielen scheint, ob ein hohes oder geringeres Maß der Überexpression der SK2 in den Zellen vorhanden ist. Diese Studie wurde mittels induzierbarer Überexpression der SK2 durchgeführt und zeigte, dass ein hohes Maß der Überexpression zu vermehrt langkettigen Ceramid-Spezies führt. Diese tragen zu einem apoptotischen Phänotyp und verminderter Zellproliferation bei. Die starke Überexpression der SK2 führte hauptsächlich zu einer Überexpression des Proteins in Zytosol und Plasmamembran. Im Vergleich dazu neigen Zellen mit einem geringeren Maß der SK2-Überexpression zu verstärktem Zellüberleben und gesteigerter Zellproliferation. Da eine moderate Erhöhung der SK2-Expression in verschiedenen Tumorarten beschrieben wurde, kann eine Inhibition der SK2 hier eine anti-kanzerogene Wirkung aufweisen (Neubauer et al. 2016).

In meiner Arbeit konnte eine vorwiegende Expression der hSK2 in der zytosolischen Fraktion mit ebenfalls gesteigerter SK2-Aktivität bestätigt werden. Obwohl durch die Überexpression der SK2 erhöhte S1P-Spiegel in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden konnten, waren die S1P-Spiegel im Kern der hSK2 tg-Zellen deutlicher erhöht. Dies führte zu der Annahme, dass es einen Transportmechanismus des zytosolischen S1P in den Kern geben könnte. In dieser Hinsicht konnten Ihlefeld et al. 2012 zeigen, dass durch eine Deletion der S1P Lyase in Fibroblasten S1P im Kern akkumuliert, obwohl S1P primär am ER gebildet wird. Weiterhin konnten Maceyka et al. 2005 nachweisen, dass die SK2 durch Nährstoffentzug vor allem am ER lokalisiert ist und dort Apoptose vermittelt. Wenn die SK1 als genetisch modifiziertes Target am ER lokalisiert ist, induziert das produzierte S1P ebenfalls Apoptose (Maceyka et al. 2005). Daraus konnte geschlossen werden, dass vor allem die Lokalisation von S1P am ER eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose spielt. Andererseits konnte in Zellen aus den Körnerzellen (Granularzelle) nachgewiesen werden, dass vor allem die Produktion von S1P durch die SK2 zu Apoptose führt (Hagen et al. 2009). In dieser Arbeit

wurde nachgewiesen, dass die nukleare Akkumulation von S1P und Sphingosin und die sehr hohen Ceramid-Spiegel im Kern nicht durch eine Kontamination mit dem ER entstanden sind. Das ER und die Kernhülle sind durch einen gemeinsamen Lipid-Monolayer miteinander verbunden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der ER-Marker Calreticulin vorwiegend in der zytosolischen Fraktion und nur mit einem Gehalt von <10% in der Kernfraktion nachzuweisen ist. Es kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass Lipide aus dem ER während der Extraktion im Kern verblieben sind und Calreticulin mit der ER-Membran in der zytosolischen Fraktion verblieben ist.

Die Rolle der SK2 bei Proliferation und Apoptose scheint gewebs- und zelltypspezifisch zu sein. So wurde in einer Studie über Dengue Virus Infektion von Leberzellen nachgewiesen, dass die SK2 eine tragende Rolle bei der Induktion von Apoptose spielt. Die Herunterregulation der SK2 durch siRNA in verschiedenen Leberzelllinien reduziert die durch Dengue Viren induzierte Caspase-9 und damit den intrinsischen Apoptose-Signalweg ohne den extrinsischen Signalweg zu beeinflussen (Morchang et al. 2017). Diese Ergebnisse gehen einher mit den in meiner Arbeit gezeigten Ergebnissen, dass die SK2 den intrinsischen Apoptose-Signalweg induziert.

Mesangiale Zellproliferation und Apoptose bilden wichtige Faktoren bei der Entstehung von mesangioproliferativer Glomerulonephritis. Die Apoptose der Mesangiumzellen bildet dabei eine sehr frühe und akute Reaktion der Erkrankung, die durch infiltrierende Immunzellen und deren freigesetzte Faktoren aktiviert wird. Es wird angenommen, dass Mesangiumzellen in dieser lytischen Phase Faktoren, wie PDGF und TGF β und ATP, sezernieren, die zur Proliferation der Mesangiumzellen führen. Dieser Schritt bringt die Krankheit in die hyperproliferative Phase. Dabei konnte bisher noch nicht geklärt werden, ob als therapeutischer Ansatz die Reduktion der Apoptose oder die Hemmung der Proliferation wirksamer sein könnte (Cybulsky 2000; Schulze-Lohoff et al. 1996; Floege et al. 1992). Wenn man davon ausgeht, dass die Apoptose der Mesangiumzellen der wichtigere Schritt ist, könnte die Hemmung der SK2 positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf haben. Damit schließt sich der Kreis zu den Ergebnissen der UUO in SK2^{-/-}-Mäusen, die eine mildere tubulointerstitielle Fibrose entwickeln und der im Gegensatz dazu verstärkten Fibrose in den hSK2 tg-Mäusen. Um die Wirkung der SK2 auf die Fibrose besser charakterisieren zu können, müssten Tierexperimente mit kürzeren UUO-Zeitpunkten durchgeführt werden, da die Apoptose wie bereits erwähnt eine frühe Reaktion in der Fibroseentwicklung darstellt.

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der SK2 und ihrer apoptotischen Wirkung dargestellt werden. Außerdem konnte mittels *in vivo* Experimenten nachgewiesen werden, dass die SK2 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von tubulointerstitieller Fibrose einnimmt. Auch für glomeruläre Erkrankungen durch *in vitro* Versuche in Mesangiumzellen konnte gezeigt werden, dass die Regulation der SK2 große Auswirkungen aufweisen kann. Somit bildet die SK2 ein wichtiges Zielprotein bei der Behandlung fibrotischer Nierenerkrankungen. Wie bereits erwähnt, wurde bisher hauptsächlich der unspezifische SK2-Hemmer ABC294640 verwendet. Ghosh et al. 2018 dagegen konnten *in vivo* bereits zeigen, dass SLP 120701 als Inhibitor die Fibroseentstehung über Makrophagen-Polarisation vermindern kann. In dieser Hinsicht sind weitere Untersuchungen nötig um spezifische, *in vitro* wirksame Inhibitoren der SK2 zu identifizieren und eine mögliche Behandlung fibrotischer Nierenerkrankungen zu erreichen.

Ein weiterer bereits bekannter Wirkstoff stellt das FTY720 dar, welches ein Prodrug ist und über eine Phosphorylierung durch SK2 zur aktiven Substanz umgewandelt wird. Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass phospho-FTY720 nicht nur über S1P-Rezeptoren wirkt, sondern im Kern auch die Histondeacetylasen hemmen kann (Newton et al. 2017; Hait et al. 2009). Histondeacetylasen können ihrerseits einen Einfluss auf die fibrotische Entwicklung nehmen. So konnte gezeigt werden, dass Hemmer der Histondeacetylasen die TGF β -vermittelten pro-fibrotischen Aktionen in der Niere vermindern können (Chun 2018). Dies macht deutlich, dass die SK2 nicht nur als direktes Zielprotein, sondern auch indirekt wirksam für die Behandlung fibrotischer Nierenerkrankungen sein kann.

6. Zusammenfassung

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Sphingolipide nicht nur eine strukturgebende Funktion in der Plasmamembran aufweisen, sondern ebenfalls als Botenstoffe intra- und extrazellulär aktiv sind. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) bildet dabei einen Schlüssel-Metaboliten, da es verschiedene Zellfunktionen wie Wachstum und Zelltod beeinflusst. Es wird durch zwei Isoformen der Sphingosinkinasen, SK1 und SK2, gebildet. Die SK1 wurde bereits gut untersucht und es konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle beim Zellwachstum einnimmt und einen entscheidenden Regulator bei inflammatorischen Erkrankungen und Krebs darstellt. Über die SK2 ist soweit wenig bekannt und die Ergebnisse sind zum Teil kontrovers. Sowohl pro-proliferative als auch anti-proliferative Funktionen der SK2 wurden beschrieben. Andererseits handelt meine Arbeit von Nierenfibrose, da beschrieben wurde, dass Sphingolipide einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen nehmen. Nierenfibrose stellt das Endstadium chronischer Nierenerkrankungen dar und führt zu einer Akkumulation der Extrazellulärmatrix, Organvernarbung und zum Verlust der Nierenfunktion. Die SK1 spielt dabei eine protektive Rolle bei der Entstehung von Nierenfibrose. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Rolle der Sk2 bei der Entstehung von Nierenfibrose untersucht werden.

Im ersten Teil meiner Arbeit wurde das Mausmodell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) verwendet, welches zur Entwicklung einer tubulointerstitiellen Nephritis und nachfolgender Fibrose führt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sowohl die Protein-Expression als auch die Aktivität der SK2 im fibrotischen Nierengewebe gesteigert wurden. Allgemein wiesen die SK2^{-/-}-Mäuse eine verminderte Fibrose in Folge des UUO auf im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dies wurde bestätigt durch eine reduzierte Kollagenakkumulation, sowie eine verminderte Protein-Expression von Fibronectin-1, Kollagen-1, *α-smooth muscle actin*, *connective tissue growth factor* (CTGF) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor1 (PAI-1). Diese Effekte gingen einher mit einer gesteigerten Protein-Expression des inhibitorischen Smad7 und erhöhten Sphingosin-Spiegeln in SK2^{-/-}-UUO-Nieren. Auf mechanistischer Ebene vermindern die erhöhten Sphingosin-Spiegel die durch *transforming growth factor-β* (TGFβ) induzierte Kollagenakkumulation, die PAI-1- und CTGF-Expression, aber induzieren die Smad7-Expression in primären Nierenfibroblasten. In einem komplementären Versuch mit hSK2 tg-Mäusen wurde eine verstärkte Entstehung von Nierenfibrose mit erhöhter Kollagenakkumulation, sowie erhöhte Protein-Expressionen von Fibronectin-1, Kollagen-1, *α-smooth muscle actin*, CTGF und PAI-1 festgestellt. Die Smad7-Expression dagegen war vermindert.

Im zweiten Teil meiner Arbeit stand der glomeruläre Teil der Niere im Fokus und es wurde untersucht, ob die Überexpression der SK2 zu einer phänotypischen Veränderung der glomerulären Mesangiumzellen führt. Mesangiumzellen wurden dazu aus den hSK2 tg-Mäuse

isoliert und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass hSK2 und mSK2 in den transgenen Zellen hauptsächlich in der zytosolischen Fraktion lokalisiert sind, während S1P ausschließlich im Kern akkumulierte. Weiterhin konnte eine verminderte Proliferation unter normalen Wachstumsbedingungen der hSK2 tg-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Die Zellen reagierten auch sensitiver auf Stress-induzierte Apoptose. Auf molekularer Ebene konnte dies durch eine reduzierte ERK- und Akt/PKB-Aktivierung erklärt werden. Nach Staurosporin-Behandlung wurde Apoptose durch den intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalweg induziert. Dabei konnte eine reduzierte anti-apoptotische Bcl-xL-Expression und vermehrte Prozessierung von Caspase-9 und Caspase-3 und PARP beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine verminderte tubulointerstitielle Fibrose-Entstehung durch die Deletion der SK2, sowie anti-proliferative und Apoptose-induzierende Effekte durch die SK2 in Mesangiumzellen nachgewiesen werden konnten. Somit könnten SK2-Inhibitoren die Entstehung tubulointerstitieller Fibrose und mit Proliferation assoziierte Erkrankungen wie mesangioproliferative Glomerulonephritis positiv beeinflussen.

7. Summary

In the last years it has been shown, that sphingolipids do not only provide structural function within the plasma membrane, but have also an active role as intra- and extracellular messenger. Sphingosine 1-phosphate (S1P) is considered as a key molecule regulating various cell functions including cell growth and death. It is produced by two isoforms of sphingosine kinases, SK1 and SK2. SK1 has been extensively studied and consistently been shown to promote cell growth and proliferation, and to regulate inflammatory diseases and cancer. There is not much known about SK2 and so far the results are partially controversial. Both pro-proliferative and anti-proliferative functions have been described. On the other hand we have a strong interest in kidney fibrosis since it has been described, that sphingolipids have a high influence on the outcome of chronic kidney diseases. Kidney fibrosis is a hallmark of chronic kidney diseases and leads to extracellular matrix accumulation, organ scarring and loss of kidney function. SK1 has been described as a protective player in development of kidney fibrosis. So, in this study the role of SK2 in development of renal fibrosis should be investigated.

In the first part of my work unilateral ureter obstruction (UUO) was used as a model for tubulointerstitial fibrosis. It could be shown, that SK2 protein and activity are upregulated in fibrotic renal tissue. In general SK2^{-/-} mice showed an attenuated fibrotic response to UUO compared to wild-type mice. This was shown by reduced collagen abundance and decreased expression of fibronectin-1, collagen-1, α -smooth muscle actin, connective tissue growth factor (CTGF), and plasminogen-activator-inhibitor1 (PAI-1). These changes were associated with increased expression of the anti-fibrotic protein Smad7 and higher levels of sphingosine in SK2^{-/-} UUO-kidneys. Mechanistically, sphingosine ameliorates transforming growth factor- β (TGF β)-induced collagen accumulation, CTGF, and PAI-1 expression, but enhances Smad7 protein expression in primary kidney fibroblasts. In a complementary approach, in hSK2 tg mice, UUO resulted in more severe fibrosis with increased collagen accumulation, higher expression levels of fibronectin-1, collagen-1, α -smooth muscle actin, CTGF, and PAI-1, but decreased Smad7 expression.

In the second part of my work the glomerular part of the kidney was in focus and the consequences of overexpressing SK2 in glomerular mesangial cells was investigated. Mesangial cells isolated from hSK2 tg mice were characterised. It was shown that hSK2 and mSK2 predominantly reside in the cytosol of transgenic cells. However, S1P accumulated strongly in the nucleus and only minimally in the cytosol of hSK2 tg cells. Functionally, hSK2 tg cells proliferated less than control cells under normal growth conditions and were also more sensitive towards stress-induced apoptosis. On the molecular level, this was reflected by reduced ERK and Akt/PKB activation, and upon staurosporine treatment, by a sensitized

mitochondrial pathway as manifested by reduced anti-apoptotic Bcl-xL expression and increased cleavage of caspase-9 and downstream caspase-3 and PARP-1.

Taken together these results demonstrate a reduced development of tubulointerstitial fibrosis by deletion of SK2 and an anti-proliferative and apoptosis-sensitizing effect for SK2 in mesangial cells. This suggests that selective inhibitors of SK2 may have impact on the outcome of tubulointerstitial fibrosis and of proliferation-associated diseases such as mesangioproliferative glomerulonephritis.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC Reagenz	<i>Avidin/Biotinylated Enzyme Complex</i>
A-SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
APAF-1	<i>apoptotic-protease-activating factor-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
CHX	Cycloheximid
cDNA	komplementäre DNA
Col1	Kollagen 1
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DAB	3, 3-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2´-Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N-N-N´-N´- tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	epitheliale zu mesenchymale Transformation
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FADD	<i>fas associated death domain</i>
FCS	fötales Kälberserum
FLIP	<i>FLICE-associated huge protein</i>
FN1	Fibronectin 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor

H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
hSK2	humane Sphingosinkinase 2
hSK2 tg	hSK2 <i>transgenic</i>
hSK2 +stop	hSK2 Kontrollen
IGF-1	<i>insuline-like growth factor-1</i>
IgG	Immunglobulin G
IPA	<i>inhibitor of apoptosis</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
LAP	<i>latency-associated peptide</i>
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie mit anschließender Tandemmassenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharid
LTBP	<i>latent TGFβ-binding protein</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mSK2	murine Sphingosinkinase 2
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaF	Natriumfluorid
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NP40	Nonidet-P40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PAS	<i>periodic acid-Schiff reaction</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonidfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
R-Smad	Rezeptor-assoziiertes Smad
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Stauro	Staurosporin
SK1	Sphingosinkinase 1
SK2	Sphingosinkinase 2
SKI II	Sphingosinkinase-Inhibitor II
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	<i>transforming growth factor-β</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp

8.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Allgemeine Chemikalien
Tab. 2	Zellkulturreagenzien und -stimulanzen
Tab. 3	Verwendete Medikamente für die Maus-Versuche
Tab. 4	Verwendet Erst-Antikörper
Tab. 5	Verwendete Zweit-Antikörper
Tab. 6	Verwendete Sonden
Tab. 7	Verwendete Enzyme und Reagenzien
Tab. 8	Zusammensetzung des Sammelgels
Tab. 9	Zusammensetzung der Trenngele

8.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Anatomie der Niere
Abb. 2	Schematischer Aufbau eines Nierenkörperchens
Abb. 3	Biologische Antworten der Mesangiumzellen auf Entzündung
Abb. 4	Merkmale der Apoptose

- Abb. 5 Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg
- Abb. 6 Schema der unilateralen Ureterobstruktion
- Abb. 7 Sphingolipid-Stoffwechsel
- Abb. 8 Signalwege der S1P-Rezeptoren
- Abb. 9 Modell der Überexpression der humanen SK2
- Abb. 10 Expression der SK2 nach UUO
- Abb. 11 Expression und Aktivität der SK2 in Wildtyp-Mäusen nach UUO
- Abb. 12 Lokalisation der SK2 in humaner Niere
- Abb. 13 CTGF- und PAI-1-Expression in Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen nach UUO
- Abb. 14 Fibronectin-, Kollagen- und α -SMA-Expression in Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen nach UUO
- Abb. 15 Immunochemischer Nachweis von Fibrosemarkern in Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen nach UUO
- Abb. 16 Analyse des Smad-Signalweges in Wildtyp- und SK2^{-/-}-Mäusen nach UUO
- Abb. 17 Quantifizierung von Sphingosin und S1P in Plasma und Nierengewebe von SK2^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach UUO
- Abb. 18 Auswirkung einer SK2-Defizienz in Maus-Nierenfibroblasten auf den Smad Signalweg und einige fibrotische Markerproteine
- Abb. 19 Wirkung einer verminderten SK2-Expression in tubulären HK2-Zellen auf die CTGF- und Smad7-Proteinexpression
- Abb. 20 SK2-Expression und -Aktivität in hSK2 tg-Nieren
- Abb. 21 CTGF-Expression in hSK2 +stop und hSK2 tg Mäusen nach UUO
- Abb. 22 Auswirkung einer systemischen hSK2 Überexpression in Mäusen auf die durch UUO ausgelöste Kollagen 1- und α -SMA-Expression in der Niere
- Abb. 23 Immunochemischer Nachweis von Fibrosemarkern in hSK2 +stop und hSK2 tg Mäusen nach UUO
- Abb. 24 Analyse des Smad-Signalweges in hSK2 +stop und hSK2 tg Mäusen nach UUO
- Abb. 25 Quantifizierung von Sphingosin und S1P in Plasma und Nierengewebe von hSK2 tg Mäusen und Kontrollmäusen nach UUO
- Abb. 26 Protein-Expression der SK2 in Nierenlysaten

Abb. 27	Expression der SK2 in Maus-Mesangiumzellen
Abb. 28	Lokalisation der SK2
Abb. 29	Aktivität der SK2 in Zytosol und Kern von hSK2 +stop und hSK2tg Maus-Mesangiumzellen
Abb. 30	Sphingolipidzusammensetzung der Maus-Mesangiumzellen in Zytosol und Kern
Abb. 31	Expression der S1P-Rezeptoren
Abb. 32	Proliferation der Maus-Mesangiumzellen
Abb. 33	Phosphorylierungsstatus von ERK und Akt
Abb. 34	Wirkung von hSK2 Überexpression auf die DNA-Fragmentierung von Maus-Mesangiumzellen
Abb. 35	Prozessierung der Caspase-9 und Expression von Bcl-xL
Abb. 36	Prozessierung der Caspase-3
Abb. 37	Prozessierung von PARP

8.4. Literaturverzeichnis

- Abboud, H. E. (2012): Mesangial cell biology. In: *Experimental cell research* 318 (9), S. 979–985. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.02.025.
- Aleman, R.; van Koppen, C. J.; Danneberg, K.; Ter Braak, M.; Meyer Zu Heringdorf, D. (2007): Regulation and functional roles of sphingosine kinases. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 374 (5-6), S. 413–428. DOI: 10.1007/s00210-007-0132-3.
- Alvarez, S. E.; Harikumar, K. B.; Hait, N. C.; Allegood, J.; Strub, G. M.; Kim, E. Y. et al. (2010): Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. In: *Nature* 465 (7301), S. 1084–1088. DOI: 10.1038/nature09128.
- Antoon, J. W.; Liu, J.; Ponnappakkam, A. P.; Gestaut, M. M.; Foroozesh, M.; Beckman, B. S. (2010): Novel D-erythro N-octanoyl sphingosine analogs as chemo- and endocrine-resistant breast cancer therapeutics. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 65 (6), S. 1191–1195. DOI: 10.1007/s00280-009-1233-0.
- Aoki, M.; Aoki, H.; Ramanathan, R.; Hait, N. C.; Takabe, K. (2016): Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation. Roles and Therapeutic Potential. In: *Mediators of inflammation* 2016, S. 8606878. DOI: 10.1155/2016/8606878.
- Awad, A. S.; Rouse, M. D.; Khutsishvili, K.; Huang, L.; Bolton, W. K.; Lynch, K. R.; Okusa, M. D. (2011): Chronic sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation attenuates early-stage diabetic nephropathy independent of lymphocytes. In: *Kidney international* 79 (10), S. 1090–1098. DOI: 10.1038/ki.2010.544.

- Bajwa, A.; Huang, L.; Kurmaeva, E.; Ye, H.; Dondeti, K. R.; Chrosicki, P. et al. (2017): Sphingosine Kinase 2 Deficiency Attenuates Kidney Fibrosis via IFN- γ . In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 28 (4), S. 1145–1161. DOI: 10.1681/ASN.2016030306.
- Bajwa, A.; Jo, S.-K.; Ye, H.; Huang, L.; Dondeti, K. R.; Rosin, D. L. et al. (2010): Activation of sphingosine-1-phosphate 1 receptor in the proximal tubule protects against ischemia-reperfusion injury. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21 (6), S. 955–965. DOI: 10.1681/ASN.2009060662.
- Baricos, W. H.; Cortez, S. L.; el-Dahr, S. S.; Schnaper, H. W. (1995): ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. In: *Kidney international* 47 (4), S. 1039–1047.
- Beaumat, F.; El Dhaybi, M.; Lasserre, J.-P.; Salin, B.; Moyer, M. P.; Verdier, M. et al. (2016): N52 monodeamidated Bcl-xL shows impaired oncogenic properties in vivo and in vitro. In: *Oncotarget* 7 (13), S. 17129–17143. DOI: 10.18632/oncotarget.7938.
- Behrends, J. C. (2012): Physiologie. 2., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Beljanski, V.; Lewis, C. S.; Smith, C. D. (2011): Antitumor activity of sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 and sorafenib in hepatocellular carcinoma xenografts. In: *Cancer biology & therapy* 11 (5), S. 524–534.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. (2013): Stryer Biochemie. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer Spektrum.
- Beyer, S.; Schwalm, S.; Pfeilschifter, J.; Huwiler, A. (2018): Renal Mesangial Cells Isolated from Sphingosine Kinase 2 Transgenic Mice Show Reduced Proliferation and are More Sensitive to Stress-Induced Apoptosis. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 47 (6), S. 2522–2533. DOI: 10.1159/000491625.
- Britten, C. D.; Garrett-Mayer, E.; Chin, S. H.; Shirai, K.; Ogretmen, B.; Bentz, T. A. et al. (2017): A Phase I Study of ABC294640, a First-in-Class Sphingosine Kinase-2 Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (16), S. 4642–4650. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2363.
- Chevalier, R. L.; Forbes, M. S.; Thornhill, B. A. (2009): Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. In: *Kidney international* 75 (11), S. 1145–1152. DOI: 10.1038/ki.2009.86.

- Chumanevich, A. A.; Poudyal, D.; Cui, X.; Davis, T.; Wood, P. A.; Smith, C. D.; Hofseth, L. J. (2010): Suppression of colitis-driven colon cancer in mice by a novel small molecule inhibitor of sphingosine kinase. In: *Carcinogenesis* 31 (10), S. 1787–1793. DOI: 10.1093/carcin/bgq158.
- Chun, J.; Brinkmann, V. (2011): A mechanistically novel, first oral therapy for multiple sclerosis: the development of fingolimod (FTY720, Gilenya). In: *Discovery medicine* 12 (64), S. 213–228.
- Chun, P. (2018): Therapeutic effects of histone deacetylase inhibitors on kidney disease. In: *Archives of pharmacal research* 41 (2), S. 162–183. DOI: 10.1007/s12272-017-0998-7.
- Chung, Arthur C. K.; Huang, Xiao R.; Zhou, Li; Heuchel, Rainer; Lai, Kar Neng; Lan, Hui Y. (2009): Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24 (5), S. 1443–1454. DOI: 10.1093/ndt/gfn699.
- Cybulsky, A. V. (2000): Growth factor pathways in proliferative glomerulonephritis. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 9 (3), S. 217–223.
- Dhami, R.; He, X.; Schuchman, E. H. (2010): Acid sphingomyelinase deficiency attenuates bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis in mice. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 26 (4-5), S. 749–760. DOI: 10.1159/000322342.
- Di Guglielmo, G. M.; Le Roy, C.; Goodfellow, A. F.; Wrana, J. L. (2003): Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. In: *Nature cell biology* 5 (5), S. 410–421. DOI: 10.1038/ncb975.
- Ding, G.; Sonoda, H.; Yu, H.; Kajimoto, T.; Goparaju, S. K.; Jahangeer, S. et al. (2007): Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (37), S. 27493–27502. DOI: 10.1074/jbc.M701641200.
- Docherty, N. G.; O'Sullivan, O. E.; Healy, D. A.; Fitzpatrick, J. M.; Watson, R. W. G. (2006): Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 290 (1), F4-13. DOI: 10.1152/ajprenal.00045.2005.
- Döll, F.; Pfeilschifter, J.; Huwiler, A. (2007): Prolactin upregulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human breast cancer cell line MCF7 and triggers enhanced

- proliferation and migration. In: *Endocrine-related cancer* 14 (2), S. 325–335. DOI: 10.1677/ERC-06-0050.
- Floege, J.; Johnson, R. J.; Couser, W. G. (1992): Mesangial cells in the pathogenesis of progressive glomerular disease in animal models. In: *The Clinical investigator* 70 (9), S. 857–864.
- French, K. J.; Zhuang, Y.; Maines, L. W.; Gao, P.; Wang, W.; Beljanski, V. et al. (2010): Pharmacology and antitumor activity of ABC294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 333 (1), S. 129–139. DOI: 10.1124/jpet.109.163444.
- Futerman, A. H.; Hannun, Y. A. (2004): The complex life of simple sphingolipids. In: *EMBO reports* 5 (8), S. 777–782. DOI: 10.1038/sj.embor.7400208.
- Ganten, D.; Ruckpaul, K.; Aretz, S. (2008): Grundlagen der Molekularen Medizin. 3., überarbeitete und erw. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin.
- Germain, M.; Mathai, J. P.; Shore, G. C. (2002): BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (20), S. 18053–18060. DOI: 10.1074/jbc.M201235200.
- Ghosh, M.; Thangada, S.; Dasgupta, O.; Khanna, K. M.; Yamase, H. T.; Kashgarian, M. et al. (2018): Cell-intrinsic sphingosine kinase 2 promotes macrophage polarization and renal inflammation in response to unilateral ureteral obstruction. In: *PloS one* 13 (3), e0194053. DOI: 10.1371/journal.pone.0194053.
- Giuliano, M.; Bellavia, G.; Lauricella, M.; D'Anneo, A.; Vassallo, B.; Vento, R.; Tesoriere, G. (2004): Staurosporine-induced apoptosis in Chang liver cells is associated with down-regulation of Bcl-2 and Bcl-XL. In: *International journal of molecular medicine* 13 (4), S. 565–571.
- Haberkant, P.; Stein, F.; Höglinger, D.; Gerl, M. J.; Brügger, B.; van Veldhoven, P. P. et al. (2016): Bifunctional Sphingosine for Cell-Based Analysis of Protein-Sphingolipid Interactions. In: *ACS chemical biology* 11 (1), S. 222–230. DOI: 10.1021/acscchembio.5b00810.
- Hagen, N.; van Veldhoven, P. P.; Proia, R. L.; Park, H.; Merrill, A. H.; van Echten-Deckert, G. (2009): Subcellular origin of sphingosine 1-phosphate is essential for its toxic effect in lyase-deficient neurons. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (17), S. 11346–11353. DOI: 10.1074/jbc.M807336200.
- Hait, N. C.; Allegood, J.; Maceyka, M.; Strub, G. M.; Harikumar, K. B.; Singh, S. K. et al. (2009): Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. In: *Science (New York, N.Y.)* 325 (5945), S. 1254–1257. DOI: 10.1126/science.1176709.

- Hait, N. C.; Oskeritzian, C. A.; Paugh, S. W.; Milstien, S.; Spiegel, S. (2006): Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. In: *Biochimica et biophysica acta* 1758 (12), S. 2016–2026. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.08.007.
- Ham, A.; Kim, M.; Kim, J. Y.; Brown, K. M.; Fruttiger, M.; D'Agati, V. D.; Lee, H. T. (2014): Selective deletion of the endothelial sphingosine-1-phosphate 1 receptor exacerbates kidney ischemia-reperfusion injury. In: *Kidney international* 85 (4), S. 807–823. DOI: 10.1038/ki.2013.345.
- Hannun, Y. A.; Bell, R. M. (1989): Regulation of protein kinase C by sphingosine and lysosphingolipids. In: *Clinica Chimica Acta* 185 (3), S. 333–345. DOI: 10.1016/0009-8981(89)90224-6.
- Hänsch, G. M.; Wagner, C.; Bürger, A.; Dong, W.; Staehler, G.; Stoeck, M. (1995): Matrix protein synthesis by glomerular mesangial cells in culture: effects of transforming growth factor beta (TGF beta) and platelet-derived growth factor (PDGF) on fibronectin and collagen type IV mRNA. In: *Journal of cellular physiology* 163 (3), S. 451–457. DOI: 10.1002/jcp.1041630304.
- Hick, C.; Hick, A. (2009): Intensivkurs Physiologie. 6. Auflage: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
- Hofmann, L. P.; 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. In: *Biological chemistry* 389 (11), S. 1399–1407. DOI: 10.1515/BC.2008.160.
- Huwiler, A.; Kolter, T.; Pfeilschifter, J.; Sandhoff, K. (2000): Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. In: *Biochimica et biophysica acta* 1485 (2-3), S. 63–99.
- Igarashi, N.; Okada, T.; Hayashi, S.; Fujita, T.; Jahangeer, S.; Nakamura, S. (2003): Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (47), S. 46832–46839. DOI: 10.1074/jbc.M306577200.
- Ihlefeld, K.; Claas, R. F.; Koch, A.; Pfeilschifter, J. M.; Meyer Zu Heringdorf, D. (2012): Evidence for a link between histone deacetylation and Ca²⁺ homeostasis in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts. In: *The Biochemical journal* 447 (3), S. 457–464. DOI: 10.1042/BJ20120811.
- Isaka, Y.; Tsujie, M.; Ando, Y.; Nakamura, H.; Kaneda, Y.; Imai, E.; Hori, M. (2000): Transforming growth factor-beta 1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis

in unilateral ureteral obstruction. In: *Kidney international* 58 (5), S. 1885–1892. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2000.00360.x.

Izzi, L.; Attisano, L. (2004): Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. In: *Oncogene* 23 (11), S. 2071–2078. DOI: 10.1038/sj.onc.1207412.

Jefferson, A. B.; Schulman, H. (1988): Sphingosine inhibits calmodulin-dependent enzymes. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (30), S. 15241–15244.

Jo, S.-K.; Bajwa, A.; Ye, H.; Vergis, A. L.; Awad, A. S.; Kharel, Y. et al. (2009): Divergent roles of sphingosine kinases in kidney ischemia-reperfusion injury. In: *Kidney international* 75 (2), S. 167–175. DOI: 10.1038/ki.2008.400.

Kaissling, B.; Lahir, M.; Kriz, W. (2013): Renal epithelial injury and fibrosis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1832 (7), S. 931–939. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.02.010.

Kaneto, H.; Ohtani, H.; Fukuzaki, A.; Ishidoya, S.; Takeda, A.; Ogata, Y. et al. (1999): Increased expression of TGF-beta1 but not of its receptors contributes to human obstructive nephropathy. In: *Kidney international* 56 (6), S. 2137–2146. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1999.00790.x.

Kavsak, P.; Rasmussen, R. K.; Causing, C. G.; Bonni, S.; Zhu, H.; Thomsen, G. H.; Wrana, J. L. (2000): Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. In: *Molecular cell* 6 (6), S. 1365–1375.

Kennedy, L.; Parapuram, S.; Greenspoon, J.; Leask, A. (2008): Ceramide inhibits CCN2 expression in fibroblasts. In: *Journal of cell communication and signaling* 2 (1-2), S. 19–23. DOI: 10.1007/s12079-008-0024-4.

Kharel, Y.; Morris, E. A.; Congdon, M. D.; Thorpe, S. B.; Tomsig, J. L.; Santos, W. L.; Lynch, K. R. (2015): Sphingosine Kinase 2 Inhibition and Blood Sphingosine 1-Phosphate Levels. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 355 (1), S. 23–31. DOI: 10.1124/jpet.115.225862.

Kharel, Y.; Raje, M.; Gao, M.; Gellett, A. M.; Tomsig, J. L.; Lynch, K. R.; Santos, W. L. (2012): Sphingosine kinase type 2 inhibition elevates circulating sphingosine 1-phosphate. In: *The Biochemical journal* 447 (1), S. 149–157. DOI: 10.1042/BJ20120609.

Klahr, S.; Morrissey, J. (2002): Obstructive nephropathy and renal fibrosis. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 283 (5), F861-75. DOI: 10.1152/ajprenal.00362.2001.

Klinke, R.; Silbernagl, S. (2010): Physiologie. 6., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: G. Thieme.

- Kohama, T.; Olivera, A.; Edsall, L.; Nagiec, M. M.; Dickson, R.; Spiegel, S. (1998): Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (37), S. 23722–23728.
- Kurihara, H.; Sakai, T. (2017): Cell biology of mesangial cells: the third cell that maintains the glomerular capillary. In: *Anatomical science international* 92 (2), S. 173–186. DOI: 10.1007/s12565-016-0334-1.
- Lan, H. Y. (2011): Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. In: *International journal of biological sciences* 7 (7), S. 1056–1067.
- Laviad, E. L.; Albee, L.; Pankova-Kholmyansky, I.; Epstein, S.; Park, H.; Merrill, A. H.; Futerman, A. H. (2008): Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (9), S. 5677–5684. DOI: 10.1074/jbc.M707386200.
- Li, J.; Qu, X.; Yao, J.; Caruana, G.; Ricardo, S. D.; Yamamoto, Y. et al. (2010): Blockade of endothelial-mesenchymal transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. In: *Diabetes* 59 (10), S. 2612–2624. DOI: 10.2337/db09-1631.
- Lipson, K. E.; Wong, C.; Teng, Y.; Spong, S. (2012): CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. In: *Fibrogenesis & tissue repair* 5 (Suppl 1), S24. DOI: 10.1186/1755-1536-5-S1-S24.
- Liu, H.; Sugiura, M.; Nava, V. E.; Edsall, L. C.; Kono, K.; Poulton, S. et al. (2000): Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (26), S. 19513–19520. DOI: 10.1074/jbc.M002759200.
- Liu, H.; Toman, R. E.; Goparaju, S. K.; Maceyka, M.; Nava, V. E.; Sankala, H. et al. (2003): Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (41), S. 40330–40336. DOI: 10.1074/jbc.M304455200.
- Liu, K.; Guo, T. L.; Hait, N. C.; Allegood, J.; Parikh, H. I.; Xu, W. et al. (2013): Biological characterization of 3-(2-amino-ethyl)-5-3-(4-butoxyl-phenyl)-propylidene-thiazolidine-2,4-dione (K145) as a selective sphingosine kinase-2 inhibitor and anticancer agent. In: *PLoS one* 8 (2), e56471. DOI: 10.1371/journal.pone.0056471.
- López-Hernández, F. J.; López-Novoa, J. M. (2012): Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. In: *Cell and tissue research* 347 (1), S. 141–154. DOI: 10.1007/s00441-011-1275-6.

Los, M.; Mozoluk, M.; Ferrari, D.; Stepczynska, A.; Stroh, C.; Renz, A. et al. (2002): Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. In: *Molecular biology of the cell* 13 (3), S. 978–988. DOI: 10.1091/mbc.01-05-0272.

Lüllmann, H.; Hein, L.; Mohr, K. (2010): Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 130 Tabellen. 17., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme (Thieme Electronic Book Library).

Maceyka, M.; Harikumar, K. B.; Milstien, S.; Spiegel, S. (2012): Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. In: *Trends in cell biology* 22 (1), S. 50–60. DOI: 10.1016/j.tcb.2011.09.003.

Maceyka, M.; Sankala, H.; Hait, N. C.; Le Stunff, H.; Liu, H.; Toman, R. et al. (2005): SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (44), S. 37118–37129. DOI: 10.1074/jbc.M502207200.

Meng, X. M.; Huang, X. R.; Chung, A. C. K.; Qin, W.; Shao, X.; Igarashi, P. et al. (2010): Smad2 protects against TGF-beta/Smad3-mediated renal fibrosis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21 (9), S. 1477–1487. DOI: 10.1681/ASN.2009121244.

Meng, X.-M.; Tang, P. M.-K.; Li, J.; Lan, H. Y. (2015): TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. In: *Frontiers in physiology* 6, S. 82. DOI: 10.3389/fphys.2015.00082.

Miyajima, A.; Chen, J.; Lawrence, C.; Ledbetter, S.; Soslow, R. A.; Stern, J. et al. (2000): Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. In: *Kidney international* 58 (6), S. 2301–2313. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00414.x.

Mizutani, N.; Omori, Y.; Tanaka, K.; Ito, H.; Takagi, A.; Kojima, T. et al. (2015): Increased SPHK2 Transcription of Human Colon Cancer Cells in Serum-Depleted Culture: The Involvement of CREB Transcription Factor. In: *Journal of cellular biochemistry* 116 (10), S. 2227–2238. DOI: 10.1002/jcb.25173.

Morchang, A.; Lee, R. C. H.; Yenchitsomanus, P.-T.; Sreekanth, G. P.; Noisakran, S.; Chu, J. J. H.; Limjindaporn, T. (2017): RNAi screen reveals a role of SPHK2 in dengue virus-mediated apoptosis in hepatic cell lines. In: *PloS one* 12 (11), e0188121. DOI: 10.1371/journal.pone.0188121.

- Mozes, M. M.; Böttinger, E. P.; Jacot, T. A.; Kopp, J. B. (1999): Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in TGF-beta transgenic mice. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10 (2), S. 271–280.
- Natoli, T. A.; Husson, H.; Rogers, K. A.; Smith, L. A.; Wang, B.; Budman, Y. et al. (2012): Loss of GM3 synthase gene, but not sphingosine kinase 1, is protective against murine nephronophthisis-related polycystic kidney disease. In: *Human molecular genetics* 21 (15), S. 3397–3407. DOI: 10.1093/hmg/dds172.
- Neubauer, H. A.; Pham, D. H.; Zebol, J. R.; Moretti, P. A. B.; Peterson, A. L.; Leclercq, T. M. et al. (2016): An oncogenic role for sphingosine kinase 2. In: *Oncotarget* 7 (40), S. 64886–64899. DOI: 10.18632/oncotarget.11714.
- Newton, J.; Hait, N. C.; Maceyka, M.; Colaco, A.; Maczys, M.; Wassif, C. A. et al. (2017): FTY720/fingolimod increases NPC1 and NPC2 expression and reduces cholesterol and sphingolipid accumulation in Niemann-Pick type C mutant fibroblasts. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31 (4), S. 1719–1730. DOI: 10.1096/fj.201601041R.
- Okada, T.; Ding, G.; Sonoda, H.; Kajimoto, T.; Haga, Y.; Khosrowbeygi, A. et al. (2005): Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (43), S. 36318–36325. DOI: 10.1074/jbc.M504507200.
- Oldroyd, S. D.; Thomas, G. L.; Gabbiani, G.; El Nahas, A. M. (1999): Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. In: *Kidney international* 56 (6), S. 2116–2127. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1999.00775.x.
- Olivera, A.; Kohama, T.; Tu, Z.; Milstien, S.; Spiegel, S. (1998): Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (20), S. 12576–12583.
- Park, I. S.; Kiyomoto, H.; Abboud, S. L.; Abboud, H. E. (1997): Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. In: *Diabetes* 46 (3), S. 473–480.
- Pitson, S. M. (2011): Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. In: *Trends in biochemical sciences* 36 (2), S. 97–107. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.08.001.
- Püschel, G. P. (2011): Taschenlehrbuch Biochemie. Stuttgart: Thieme.
- Pyne, N. J.; Pyne, S. (2010): Sphingosine 1-phosphate and cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 10 (7), S. 489–503. DOI: 10.1038/nrc2875.

- Ren, S.; Babelova, A.; Moreth, K.; Xin, C.; Eberhardt, W.; Doller, A. et al. (2009): Transforming growth factor-beta2 upregulates sphingosine kinase-1 activity, which in turn attenuates the fibrotic response to TGF-beta2 by impeding CTGF expression. In: *Kidney international* 76 (8), S. 857–867. DOI: 10.1038/ki.2009.297.
- Riedl, S. J.; Shi, Y. (2004): Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (11), S. 897–907. DOI: 10.1038/nrm1496.
- Saikumar, P.; Dong, Z.; Mikhailov, V.; Denton, M.; Weinberg, J. M.; Venkatachalam, M. A. (1999): Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. In: *The American journal of medicine* 107 (5), S. 489–506.
- Schlöndorff, D.; Banas, B. (2009): The mesangial cell revisited: no cell is an island. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20 (6), S. 1179–1187. DOI: 10.1681/ASN.2008050549.
- Schulze-Lohoff, E.; Ogilvie, A.; Sterzel, R. B. (1996): Extracellular nucleotides as signalling molecules for renal mesangial cells. In: *Journal of autonomic pharmacology* 16 (6), S. 381–384.
- Schwalm, S.; Beyer, S.; Frey, H.; Haceni, R.; Grammatikos, G.; Thomas, D. et al. (2017): Sphingosine kinase-2 deficiency ameliorates kidney fibrosis by up-regulating Smad7 in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. In: *The American journal of pathology*. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.06.017.
- Schwalm, S.; Pfeilschifter, J.; Huwiler, A. (2013): Sphingosine-1-phosphate: a Janus-faced mediator of fibrotic diseases. In: *Biochimica et biophysica acta* 1831 (1), S. 239–250. DOI: 10.1016/j.bbali.2012.07.022.
- Schwalm, S.; Pfeilschifter, J.; Huwiler, A. (2014): Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway to treat chronic inflammatory kidney diseases. In: *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 114 (1), S. 44–49. DOI: 10.1111/bcpt.12103.
- Schwalm, S.; Timcheva, T. M.; Filipenko, I.; Ebadi, M.; Hofmann, L. P.; Zangemeister-Wittke, U. et al. (2015): Sphingosine kinase 2 deficiency increases proliferation and migration of renal mouse mesangial cells and fibroblasts. In: *Biological chemistry* 396 (6-7), S. 813–825. DOI: 10.1515/hsz-2014-0289.
- Scindia, Y. M.; Deshmukh, U. S.; Bagavant, H. (2010): Mesangial pathology in glomerular disease: targets for therapeutic intervention. In: *Advanced drug delivery reviews* 62 (14), S. 1337–1343. DOI: 10.1016/j.addr.2010.08.011.
- Sensken, S.-C.; Bode, C.; Nagarajan, M.; Peest, U.; Pabst, O.; Gräler, M. H. (2010): Redistribution of sphingosine 1-phosphate by sphingosine kinase 2 contributes to

lymphopenia. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (8), S. 4133–4142. DOI: 10.4049/jimmunol.0903358.

Shi, W.; Sun, C.; He, B.; Xiong, W.; Shi, X.; Yao, D.; Cao, X. (2004): GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. In: *The Journal of cell biology* 164 (2), S. 291–300. DOI: 10.1083/jcb.200307151.

Shiohira, S.; Yoshida, T.; Sugiura, H.; Nishida, M.; Nitta, K.; Tsuchiya, K. (2013): Sphingosine-1-phosphate acts as a key molecule in the direct mediation of renal fibrosis. In: *Physiological reports* 1 (7), e00172. DOI: 10.1002/phy2.172.

Sonoda, S.; Nagineni, C. N.; Kitamura, M.; Spee, C.; Kannan, R.; Hinton, D. R. (2014): Ceramide inhibits connective tissue growth factor expression by human retinal pigment epithelial cells. In: *Cytokine* 68 (2), S. 137–140. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.03.011.

Strub, G. M.; Maceyka, M.; Hait, N. C.; Milstien, S.; Spiegel, S. (2010): Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. In: *Advances in experimental medicine and biology* 688, S. 141–155.

Thangada, S.; Shapiro, L. H.; Silva, C.; Yamase, H.; Hla, T.; Ferrer, F. A. (2014): Treatment with the immunomodulator FTY720 (fingolimod) significantly reduces renal inflammation in murine unilateral ureteral obstruction. In: *The Journal of urology* 191 (5 Suppl), S. 1508–1516. DOI: 10.1016/j.juro.2013.10.072.

Truong, L. D.; Gaber, L.; Eknoyan, G. (2011): Obstructive uropathy. In: *Contributions to nephrology* 169, S. 311–326. DOI: 10.1159/000314578.

Ucero, A. C.; Benito-Martin, A.; Izquierdo, M. C.; Sanchez-Niño, M. D.; Sanz, A. B.; Ramos, A. M. et al. (2014): Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. In: *International urology and nephrology* 46 (4), S. 765–776. DOI: 10.1007/s11255-013-0520-1.

Ulloa, L.; Doody, J.; Massagué, J. (1999): Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. In: *Nature* 397 (6721), S. 710–713. DOI: 10.1038/17826.

Vega, G.; Alarcón, S.; San Martín, R. (2016): The cellular and signalling alterations conducted by TGF-β contributing to renal fibrosis. In: *Cytokine* 88, S. 115–125. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.08.019.

Venkatachalam, M. A.; Griffin, K. A.; Lan, R.; Geng, H.; Saikumar, P.; Bidani, A. K. (2010): Acute kidney injury. A springboard for progression in chronic kidney disease. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 298 (5), F1078-94. DOI: 10.1152/ajprenal.00017.2010.

- Verzola, D.; Gandolfo, M. T.; Ferrario, F.; Rastaldi, M. P.; Villaggio, B.; Gianiorio, F. et al. (2007): Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy. In: *Kidney international* 72 (10), S. 1262–1272. DOI: 10.1038/sj.ki.5002531.
- Visse, R.; Nagase, H. (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. In: *Circulation research* 92 (8), S. 827–839. DOI: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
- Wahab, N. A.; Harper, K.; Mason, R. M. (1996): Expression of extracellular matrix molecules in human mesangial cells in response to prolonged hyperglycaemia. In: *The Biochemical journal* 316 (Pt 3), S. 985–992.
- Wang, W.; Huang, X. R.; Li, A. G.; Liu, F.; Li, J.-H.; Truong, L. D. et al. (2005): Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation. Role of Smad7. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16 (5), S. 1371–1383. DOI: 10.1681/ASN.2004121070.
- Weng, H.; Mertens, P. R.; Gressner, A. M.; Dooley, S. (2007): IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. In: *Journal of hepatology* 46 (2), S. 295–303. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.09.014.
- Woodcock, J. M.; Ma, Y.; Coolen, C.; Pham, D.; Jones, C.; Lopez, A. F.; Pitson, S. M. (2010): Sphingosine and FTY720 directly bind pro-survival 14-3-3 proteins to regulate their function. In: *Cellular signalling* 22 (9), S. 1291–1299. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.04.004.
- 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. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (34), S. 35255–35262. DOI: 10.1074/jbc.M312091200.
- Xu, M.; Liu, D.; Ding, L.; Ma, K.; Wu, M.; Lv, L. et al. (2014): FTY720 inhibits tubulointerstitial inflammation in albumin overload-induced nephropathy of rats via the Sphk1 pathway. In: *Acta pharmacologica Sinica* 35 (12), S. 1537–1545. DOI: 10.1038/aps.2014.100.
- Yan, X.; Liu, Z.; Chen, Y. (2009): Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 41 (4), S. 263–272.
- Zeisberg, M.; Neilson, E. G. (2010): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21 (11), S. 1819–1834. DOI: 10.1681/ASN.2010080793.
- Zemann, B.; Kinzel, B.; Müller, M.; Reuschel, R.; Mechtcheriakova, D.; Urtz, N. et al. (2006): Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. In: *Blood* 107 (4), S. 1454–1458. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2628.

Zhang, S.; Fei, T.; Zhang, L.; Zhang, R.; Chen, F.; Ning, Y. et al. (2007): Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. In: *Molecular and cellular biology* 27 (12), S. 4488–4499. DOI: 10.1128/MCB.01636-06.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle Stellen, die ich wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen genommen habe, sind als solche kenntlich gemacht. Außerdem habe ich mich auch keiner anderen als der angegebenen Literatur oder sonstiger Hilfsmittel bedient. Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht worden.

Ort, Datum

Unterschrift