

**Die Rolle des S1P-Rezeptors S1P<sub>5</sub>,  
des S1P-Transporters Spinster 2 und  
der kettenlängenspezifischen Ceramide bei  
Nierenfibrose**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Timon Sebastian Eckes**  
aus Bad Soden (Taunus)

Frankfurt am Main (2021)  
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (14) der  
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber  
Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

Datum der Disputation:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1	<b>Die Niere</b>	1
1.1.1	Lage und Aufbau	1
1.1.2	Aufbau und Funktion des Glomerulums und Tubulussystems	2
1.2	<b>Nierenfibrose</b>	4
1.3	<b>Sphingolipide</b>	7
1.3.1	Geschichte	7
1.3.2	Metabolismus	9
1.3.3	Sphingosinkinase-1 und Sphingosinkinase-2	11
1.3.4	Der S1P-Transporter Spinster Homolog 2 (Spns2)	13
1.3.5	Die S1P-Rezeptoren	16
1.3.6	Die Rolle der S1P-Rezeptoren bei renaler Fibrose	20
1.3.7	Ceramide	21
1.4	<b>Zielsetzung</b>	25
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	26
2.1	<b>Material</b>	26
2.1.1	Zellen	26
2.1.2	Kulturmedien und Zusätze	26
2.1.3	Zusammensetzung des Wachstumsmediums	27
2.1.4	Zusammensetzung anderer Medien	27
2.1.5	Geräte	28
2.1.6	Chemikalien	29
2.1.7	Proteine und Reagenzien	31
2.1.8	Antikörper für Western Blot	32
2.1.9	Kits	33
2.1.10	Angesetzte Lösungen	33

2.1.11	Puffer .....	34
2.1.12	TaqMan®-Sonden .....	35
2.1.1	Primer für die Genotypisierungen .....	36
2.1.1	Software.....	36
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	37
2.1.3	Verwendete Tiere.....	38
<b>2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>39</b>
2.2.1	Isolation von Glomerula zur Kultivierung von Mesangiumzellen der Maus .....	39
2.2.2	Kultivierung der Zellen .....	39
2.2.3	Stimulation adhärent wachsender Zellen .....	40
2.2.4	Zellzählung.....	40
2.2.5	Kryokonservierung.....	41
<b>2.3</b>	<b>Modell der Adenin-induzierten tubulointerstitiellen Nierenfibrose der Maus</b> .....	<b>41</b>
<b>2.4</b>	<b>Lipid-Analyse mittels LC-ESI-MS/MS</b> .....	<b>43</b>
2.4.1	Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion .....	44
<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>45</b>
2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	45
2.5.2	RNA-Isolierung.....	46
2.5.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung isolierter RNA .....	47
2.5.4	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) .....	47
2.5.5	Quantitative Real-Time-PCR (Taqman®) .....	48
<b>2.6</b>	<b>Biochemische Methoden</b> .....	<b>49</b>
2.6.1	Präparation von Zelllysaten und Gewebehomogenisaten .....	49
2.6.2	Bestimmung des Proteingehaltes .....	50
2.6.3	Trichloressigsäure-Proteinfällung aus Zellkulturüberständen .....	50
2.6.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51

2.6.5	Western Blot-Analyse .....	52
<b>2.7</b>	<b>Histologische Immunchemie .....</b>	<b>54</b>
2.7.1	Vorbereitung der Paraffinblöcke.....	54
2.7.2	PAS-Reaktion .....	55
2.7.3	Makrophagen-Infiltration .....	55
<b>2.8</b>	<b>Datenanalyse und Präsentation.....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchung der Rolle des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors 5 (S1P<sub>5</sub>) in fibrotischen Nierenerkrankungen .....</b>	<b>57</b>
3.1.1	S1P <sub>5</sub> -Expression ist erhöht in fibrotischem Nierengewebe .....	57
3.1.2	S1P <sub>5</sub> <sup>-/-</sup> -Mäuse zeigen einen milderen Verlauf bei der .....	
	Adenin-induzierten Nephropathie.....	58
3.1.3	Untersuchung des Gewebeschadens .....	60
3.1.4	Untersuchung von Entzündungsmarkern .....	63
3.1.5	Untersuchung der Nieren auf Fibrose .....	66
3.1.6	Untersuchung des Sphingolipidmetabolismus .....	68
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung der Veränderungen von kettenlängen-spezifischen Ceramiden in fibrotischen Nieren.....</b>	<b>72</b>
3.2.1	Veränderungen der Konzentrationen von Ceramiden in humanen .....	
	Nierenrinden bei Fibrose.....	72
3.2.2	Veränderungen der Konzentrationen von Ceramiden in humanem .....	
	Nierenmark bei Fibrose.....	76
3.2.3	Unterschiede der Konzentrationen von kettenlängen-spezifischen.....	
	Ceramiden zwischen Nierenrinde und Nierenmark in gesunden .....	
	Biopsien .....	79
3.2.4	Veränderungen der Konzentrationen von kettenlängen-spezifischen .....	
	Ceramiden in murinem Nierengewebe.....	81
<b>3.3</b>	<b>Die Rolle des Sphingosin-1-Phosphat-Transporters Spns2 .....</b>	<b>84</b>
	<b>im Kontext der Nierenfibrose .....</b>	<b>84</b>

3.3.1	Die Genexpression der SK-1 und S1P-Lyase ist unverändert in..... Spns2 <sup>-/-</sup> -Zellen im Vergleich zu Spns2 <sup>+/+</sup> -Zellen.....	85
3.3.2	Spns2 <sup>-/-</sup> -Zellen bilden weniger CTGF nach Stimulation mit TFG-β <sub>2</sub> .....	87
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>88</b>
4.1	Untersuchung der Rolle des Sphingosin-1-Phosphat Rezeptors 5 ..... (S1P <sub>5</sub> ) in fibrotischen Nierenerkrankungen .....	88
4.2	Untersuchung der Veränderungen von kettenlängen-spezifischen ..... Ceramiden in fibrotischen Nieren.....	92
4.3	Die Rolle des Sphingosin-1-Phosphat-Transporters Spns2 ..... im Kontext der Nierenfibrose .....	98
<b>5</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>107</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	107
8.2	Tabellenverzeichnis.....	113
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	114
8.4	Literaturverzeichnis.....	117
	<b>Kooperationspartner</b> .....	<b>147</b>
	<b>Erklärung</b> .....	<b>148</b>

# 1 Einleitung

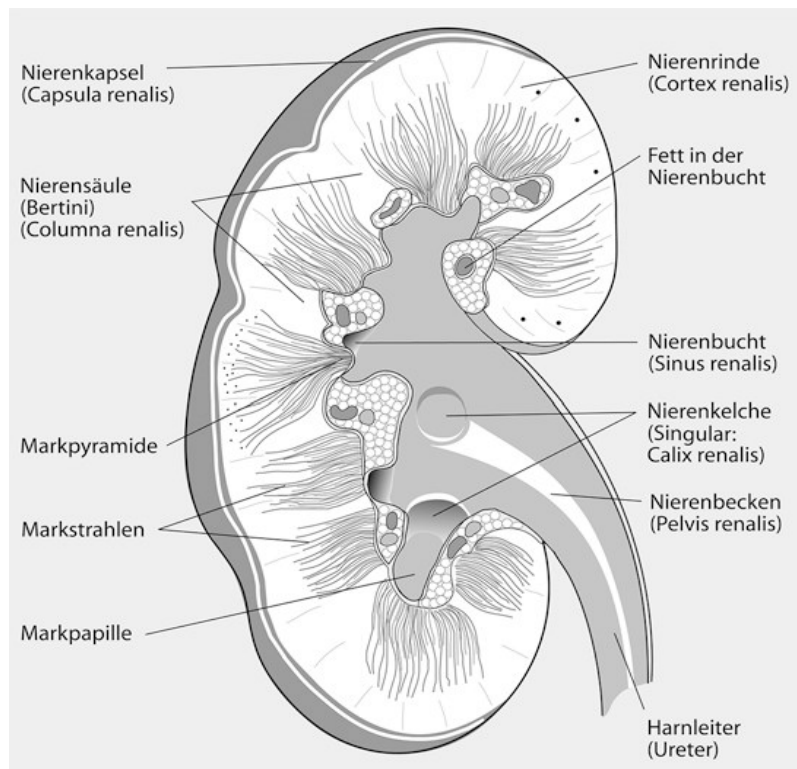
## 1.1 Die Niere

### 1.1.1 Lage und Aufbau

Die Nieren sind ein paarig angelegtes Organ, welches lebenswichtige Funktionen für den Organismus ausübt und seitlich im Retroperitonealraum liegt. Eine einzelne Niere eines ausgewachsenen Menschen ist in der Regel ca. 12 cm lang, 6 cm breit und wiegt etwa 150 g und wird von einer Kapsel aus Bindegewebe (*Capsula fibrosa renis*) und einer Fettkapsel (*Capsula adiposa renis*) umgeben. Grob wird die Niere in Nierenhilus und Nierenparenchym unterteilt (Klinge und Brodmann 2017).

Im Nierenhilus findet der Bluttransport über die *Arteria renalis* und *Vena renalis* als auch der Abtransport des Urins über den Harnleiter (*Ureter*) zur Blase statt. Das Nierenparenchym besteht aus der 1-1,5 cm dicken Rinde (*Cortex renalis*) und dem innenliegenden Mark (*Medulla renalis*) (Abbildung 1). Die Niere ist von einer Schicht aus Bindegewebe, der Nierenkapsel, umhüllt. Das Nierenmark ist in 10-12 kegelförmige Markpyramiden (*Pyramides renales*) unterteilt. Eine Markpyramide besitzt breit gefächerte Markstrahlen, die in Richtung Nierenrinde zeigen, und in entgegengesetzter Richtung spitz zulaufende Nierenpapillen (*Papillae renales*), welche in einen kleinen Nierenkelch (*Calix renales*) münden. Die kleinen und großen Nierenkelche (*Calices minores renales et calices majores renales*) vereinen sich zum Nierenbecken (*Pelvis renalis*), welches sich zum Harnleiter verjüngt.

Die Nephronen erstrecken sich über Rinde und Mark und bilden die funktionellen Einheiten der Niere, in denen unter anderem die Bildung des Urins stattfindet. Das Nephron besteht zum einen aus dem Glomerulum, welches im Bereich des Cortex liegt und als eine Art Filter den Primärharn aus dem Blut abpresst. Den anderen Teil des Nephrons bildet das tubuläre System, welches im Mark sitzt und für die Resorption von Wasser, Glucose und Salzen aus dem Primärharn verantwortlich ist, aber auch zur Sekretion von bestimmten Elektrolyten dient. Eine einzelne menschliche Niere enthält ca. 1-3 Millionen Nephronen (Klinge und Brodmann 2017).



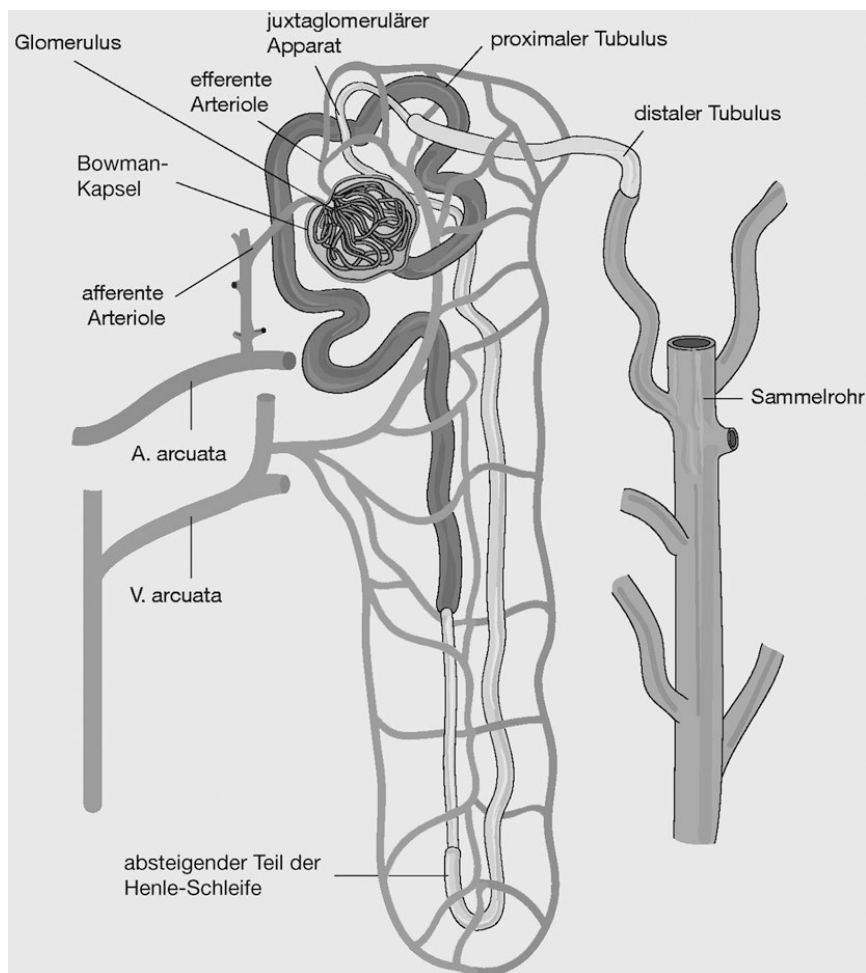
**Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Niere.** Makroskopischer Längsschnitt durch die Niere mit Unterteilung in Nierenrinde und Nierenmark. Diese beherbergen die Nephronen, welche den Harn über Sammelrohre in das Nierenbecken und zu den abführenden Harnwegen leiten (Abb. von Nowack *et al.* 2009).

### 1.1.2 Aufbau und Funktion des Glomerulums und Tubulussystems

Das Glomerulum ist die kugelförmige Filtrationseinheit, die aus einer Hülle, der Bowman-Kapsel, und einem innenliegenden Gefäßknäuel besteht (Klinge und Brodmann 2017). Dieses Gefäßknäuel besteht aus feinen Kapillaren, aus deren Lücken Flüssigkeit aus dem Blut heraus in die Bowman-Kapsel gelangen kann. Die Kapillaren entstammen einer afferenten Arteriole und das gefilterte Blut verlässt das Glomerulum wieder in einer vereinten efferenten Arteriole (Abbildung 2). Podozyten, die ihren Namen durch ihre langen, ineinander verzahnten Fortsätze erhalten haben, bilden die Schlitzmembran als wichtigen Bestandteil der Blut-Harn-Schranke. Sie liegen auf den Endothelzellen der Kapillaren auf und sorgen dafür, dass Moleküle ab einer Größe von ca. 65.000 Dalton (wie zum Beispiel Albumin) nicht in den Primärharn gelangen. Des Weiteren sorgt die negative Ladung der Basalmembran dafür, dass insbesondere Proteine nicht aus dem Blut gefiltert werden. Im Laufe eines Tages



werden ca. 180 Liter (60-faches Plasmavolumen) Primärharn abgepresst. Dieser Primärharn läuft anschließend durch das Tubulussystem und aufgrund von Rückresorption bleibt zum Schluss lediglich ein Volumen von 1,5-2 Liter übrig, welches als Urin ausgeschieden wird.



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Nephrons.** Das Nephron, als kleinste Funktionseinheit der Niere, bestehend aus Nierenkörperchen und Tubulussystem, filtert den Primärharn, aus dem im Anschluss verschiedene Stoffe sowohl sezerniert als auch rückresorbiert werden. Das Tubulussystem konzentriert den Harn und mündet in das Sammelrohr. Der juxtaglomeruläre Apparat steuert den Filtrationsdruck zur Primärharnbildung und reguliert den Blutdruck (Abb. von Larsen 2016).

Neben Wasser und Elektrolyten werden auch nützliche Blutbestandteile wie Glucose, kleine Proteine und Aminosäuren rückresorbiert. In ihrer Aufgabe als exkretorisches Organ werden über die Niere harnpflichtige Endprodukte des Purin- und Stickstoffstoffwechsels (Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure) sowie vom Körper aufgenommene Fremdstoffe über den gebildeten Harn ausgeschieden. Des Weiteren

werden auch überschüssige Elektrolyte und Säuren aus dem Körper entfernt und somit reguliert die Niere den Elektrolythaushalt und das Säure-Basen-Gleichgewicht.

Die Niere übernimmt zusätzlich auch Aufgaben eines endokrines Organs und ist involviert in der Synthese und Metabolisierung von Hormonen wie Prostaglandinen und Erythropoetin (Klinge und Brodmann 2017). Über das Renin-Angiotensin-System wird, ausgehend von der Niere, Einfluss auf den Blutdruck und Elektrolythaushalt genommen. Zusätzlich wird in den proximalen Tubuluszellen Calcitriol, die aktive Form von Vitamin D<sub>3</sub>, gebildet, wodurch der Kalzium- und Phosphathaushalt reguliert wird. Die Tubuli sind umgeben von Kapillaren, wodurch ein Austausch von Wasser und anderen Molekülen zwischen dem im Tubuluslumen befindlichem Urin und dem Blut stattfinden kann. Letztendlich mündet das Tubulussystem aus dem Nierenmark in das Nierenbecken und der Urin wird von dort aus über den Ureter zur Harnblase geführt.

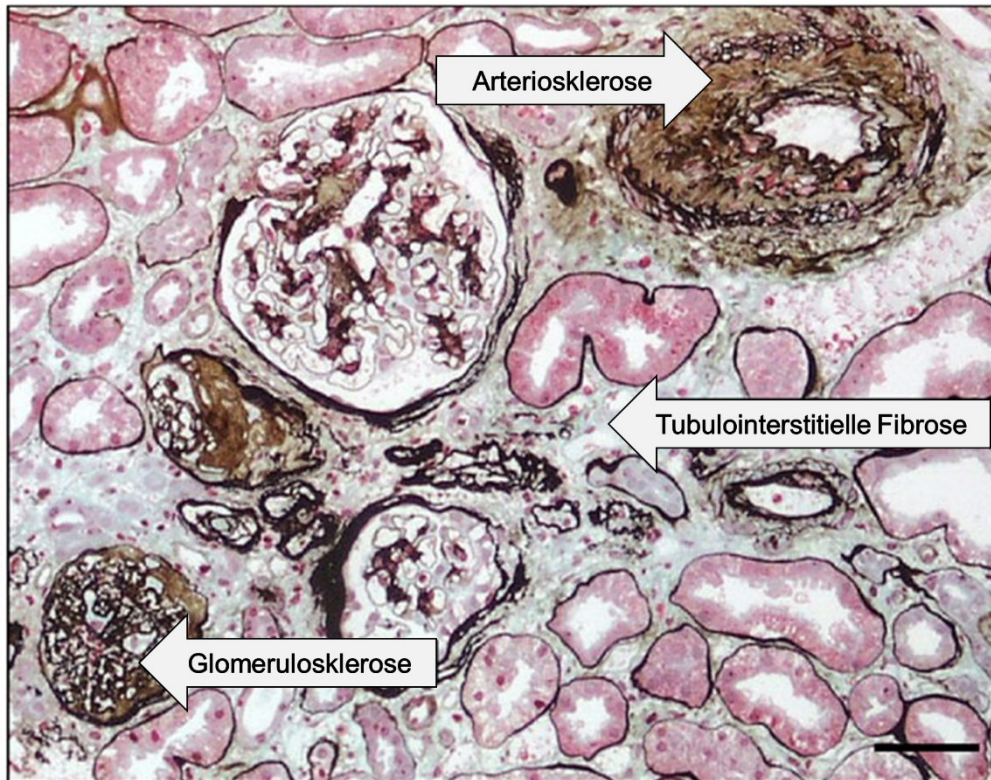
## 1.2 Nierenfibrose

Eine Fibrose beschreibt die übermäßige, unkontrollierte Ablagerung von Bindegewebe nach Gewebeschädigung, welche zur Narbenbildung (Sklerose) im Gewebe führt. Die Filtration des Blutes in der Niere wird hierdurch gestört, was zu einem völligen Funktionsverlust des Organs führen kann. Die Fibrose ist ein wichtiges Charakteristikum von nahezu jeder Form der chronischen Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease*, CKD) an der allein in den Vereinigten Staaten über 30 Millionen Menschen leiden (Saran *et al.* 2019). Es wird zudem vom US Zentrum für Krankheitskontrolle und Prävention befürchtet, dass 47% der über 30 Jahre alten Bürger in ihrem Leben an einer CKD erkranken werden (Hoerger *et al.* 2010). Dies liegt auch an der rasant steigenden Anzahl an Diabetikern, von denen 36% an einer CKD leiden und die als diabetische Nephropathie (DN) bezeichnet wird (Saran *et al.* 2019). Dieser hohe Anteil wirkt besonders dramatisch, da die Anzahl der Diabetiker im Jahr 2019 weltweit schon auf 463 Millionen Erwachsene (über 20 Jahre) gestiegen ist und im Jahr 2045 bei 700 Millionen liegen könnte (Saeedi *et al.* 2019). Über das Leiden der Menschen hinaus bedeutet dies auch eine große finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem und verschlingt jetzt schon allein in den USA jährlich über 80 Milliarden USD für die Behandlung der CKD und über 30 Milliarden USD für die

terminale Niereninsuffizienz (*end-stage renal disease*, ESRD), der letzten Stufe der CKD (Saran *et al.* 2020). Leider gibt es bisher nur wenige pharmakologische Therapiemöglichkeiten zur Verlangsamung der Progression der CKD wie die Inhibierung des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (*angiotensin converting enzyme*, ACE), Blockade des Angiotensinrezeptors I, Blutdruckkontrolle und Natriumbikarbonat gegen metabolische Azidose ("KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update" 2012). Die Behandlungserfolge sind jedoch immer noch gering. Ungefähr 16% der Dialysepatienten versterben und die Zahl der Patienten, welche an einer CKD und später ESRD erkranken, steigt weiterhin an (Saran *et al.* 2020).

Die Fibrose ist ein Krankheitsbild, welches sich nicht nur in der Niere, sondern in vielen Organen in gleicher Weise finden lässt und es wird vermutet, dass fast die Hälfte aller Todesursachen in den entwickelten Ländern auf fibrotische Erkrankungen zurückzuführen sind (Wynn 2008). Unter anderem spielen fibrotische Prozesse auch bei Zirrhose, Kardiomyopathien und idiopathischer Lungenfibrose eine wichtige Rolle (Wynn 2011; Ke und Chen 2012; Weber *et al.* 2013; Kong *et al.* 2014).

Die Nierenfibrose kann durch einen Gewebeschaden, Entzündung oder auch hohe Glukosespiegel verursacht werden (Paradis *et al.* 2001; Li *et al.* 2003; Yang *et al.* 2011). Die extrazellulären Matrixproteine, welche das Bindegewebe bilden, lagern sich bei der Nierenfibrose besonders im Interstitium (tubulointerstitielle Fibrose) aber auch in den Glomeruli (Glomerulosklerose) und in den Blutgefäßen (Arteriosklerose) an (Abbildung 3). Kollagen I, das am häufigsten gebildete Matrixprotein, aber auch Kollagen III, V, VI, VII und XV und auch Fibronectin werden bei Fibrose verstärkt exprimiert (Genovese *et al.* 2014). Für die tubulointerstitielle Fibrose spielen vor allem aktivierte Fibroblasten eine Rolle, welche sich anhand der Expression von *alpha-smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA), das Mikrofilamente für die Anheftung der Zellen an die ECM bildet, erkennen lassen (Zhou und Liu 2016). Für die Entstehung einer Glomerulosklerose sind vor allem Mesangiumzellen verantwortlich, welche durch Proliferation und exzessiver Bildung extrazellulärer Matrix für die Zerstörung der empfindlichen Filtrationseinheit sorgen können (Wahab *et al.* 1996; Lee 2011).



**Abbildung 3: Histologischer Schnitt durch eine fibrotische Niere.** Methenamin-basierte Silberfärbungen mit Masson-Trichrom-Gegenfärbung. Braune Färbung der Kollagenfasern der glomerulären Basalmembran und der Gefäßwände und leicht grüne Färbung des interstitiellen Bindegewebes. Der Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$  (Abb. modifiziert von Hewitson 2012).

Eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Fibrose und in der Steuerung der Myofibroblasten spielt das Zytokin *transforming growth factor beta-1* ( $\text{TGF-}\beta_1$ ) (Kanzler *et al.* 1999; Grupp *et al.* 2001). Es wird vermutet, dass Tubuluszellen in der Lage sind über die sogenannte Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) teilweise einen myofibroblastenartigen Phänotyp zu erlangen. In diesem Kontext wurden mehrere Modelle zur CKD wie Unilaterale Ureterobstruktion (UUO), Nephrotoxische Serumnephritis und Folsäure-induzierte Nephropathie mit konditionellen Snai1- oder Twist1-Knockout-Mäusen untersucht (Grande *et al.* 2015; Lovisa *et al.* 2015). Diese Studien zeigten, dass die Nierenfibrose durch die in den Knockout-Mäusen erreichte Inhibition des EMT-Programms reduziert und die Funktion und Regeneration der Tubuluszellen verbessert werden konnte.

Des Weiteren führt auch eine gestörte Beta-Oxidation in den Tubuluszellen zu ATP-Mangel, Lipidakkumulation und Zelltod, wodurch eine Nierenfibrose begünstigt wird (Kang *et al.* 2015). Untersuchungen von Kang *et al.* (2015) zeigten, dass der stark profibrotische Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  in der Lage ist, die Expression wichtiger Enzyme wie die Carnitin-Palmitoyltransferase 1, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Beta-Oxidation durchführt, zu unterdrücken. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass TGF- $\beta$  auch über microRNA-21 den Metabolismus in Tubuli stören und somit zur Fibrose beitragen kann (Gomez *et al.* 2015).

## 1.3 Sphingolipide

### 1.3.1 Geschichte

Sphingolipide sind essentielle Bestandteile von eukaryotischen Zellmembranen und wurden auch in manchen Prokaryoten nachgewiesen (LaBach und White 1969; Hannun und Bell 1989). Das strukturelle Rückgrat aller Sphingolipide bildet das Molekül Sphingosin. Sphingolipide werden vermehrt im Nervengewebe gefunden und haben verschiedene Funktionen inne.

Die Stoffklasse der Sphingolipide wurde erstmals 1884 vom hessischen Arzt Johann Ludwig Wilhelm Thudichum in seiner Arbeit „*A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*“ beschrieben, nachdem er diese aus den Gehirnen von Ochsen und Menschen isoliert hatte. Da ihre Struktur und Funktion für ihn ein Rätsel darstellte, benannte er sie nach der mythischen Figur Sphinx (Huwiler *et al.* 2000; Futerman und Hannun 2004). Zunächst wurde davon ausgegangen, dass Sphingolipide lediglich eine strukturelle Aufgabe für Zellmembranen haben und es dauerte etwa hundert Jahre bis gezeigt werden konnte, dass bestimmte Sphingolipide als Signalmoleküle wirken können.

So wurde 1991 herausgefunden, dass Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in der Lage ist, Genexpression und Proliferation in Swiss 3T3-Fibroblasten zu induzieren und ihre Morphologie zu beeinflussen (Zhang *et al.* 1991). Darüber hinaus wurde in dieser Studie festgestellt, dass die Stimulation dieser Zellen mit S1P zur Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Calciumionen führt.

Anschließend wurde die Wirkung von S1P, welches in hoher Konzentration in fötalem Kälberserum (FKS) gefunden wurde, als proliferationsfördernder *second messenger* im Signalweg des *platelet-derived growth factor* (PDGF) beschrieben (Olivera und Spiegel 1993).

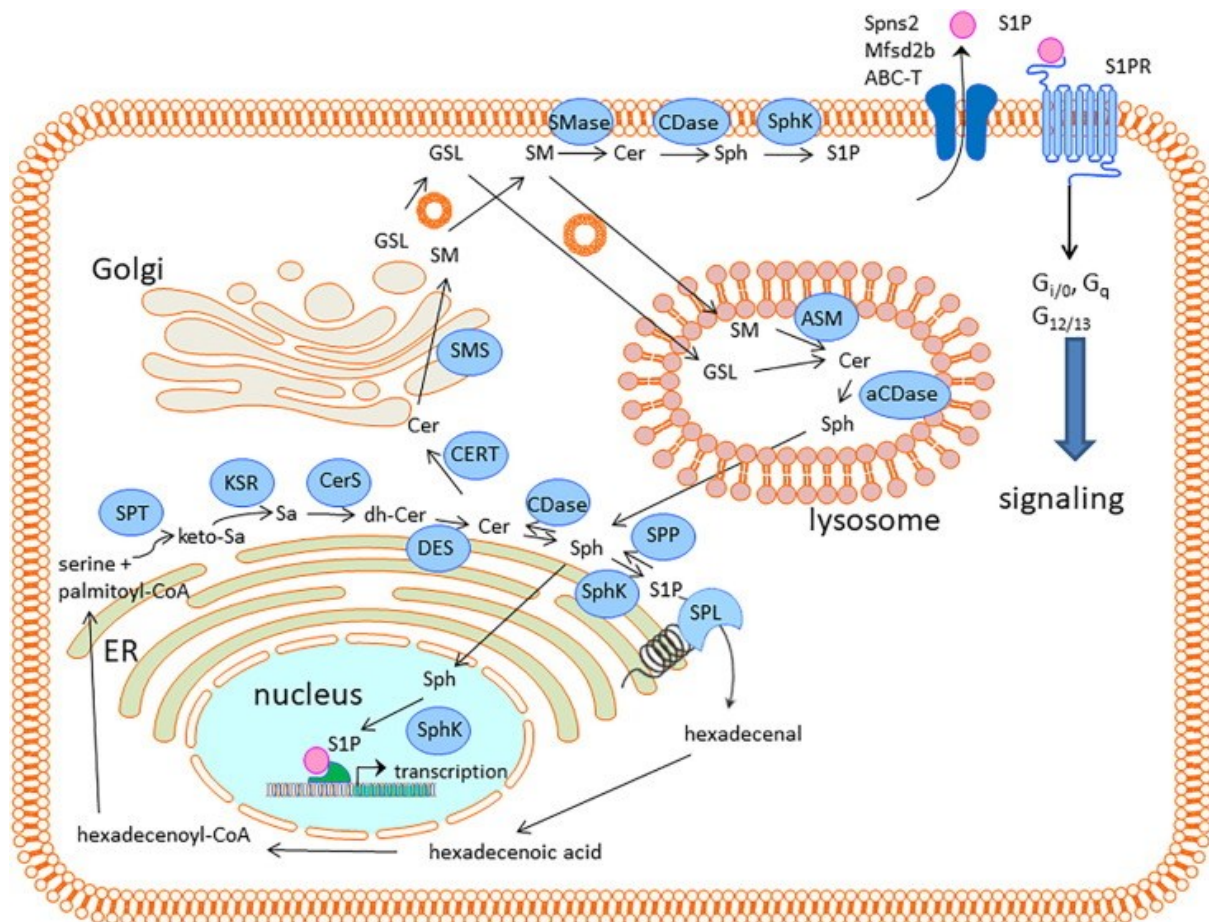
Zur selben Zeit wurde hingegen anhand des synthetischen, kurzkettigen C2-Ceramids auch gezeigt, dass andere Sphingolipide in der Lage sind, Apoptose zu induzieren (Obeid *et al.* 1993). Diese gegensätzlichen Effekte von bestimmten Ceramiden und S1P, die metabolisch nur durch zwei enzymatisch katalysierte Umwandlungen getrennt sind und über das Schicksal einer Zelle entscheiden können, wurden daraufhin in der Sphingolipid-Rheostat-Theorie zusammengefasst (Cuvillier *et al.* 1996).

Die besondere Rolle von S1P für die Medizin wurde schließlich durch die Entdeckung der S1P-Rezeptoren möglich. 1998 wurde beschrieben, dass S1P als Ligand eines G-Protein-gekoppelter-Rezeptor fungiert (Lee *et al.* 1998). Dieser Rezeptor war bis dahin als *endothelial differentiation gene 1* (EDG-1) bezeichnet worden, doch nach der Identifizierung des Liganden in S1P-Rezeptor-1 (S1P<sub>1</sub>) umbenannt worden (Wang *et al.* 2001). Zwei Jahre später wurde der fünfte und bisher letzte bekannte S1P-Rezeptor (EDG-8), jetzt als S1P<sub>5</sub> bekannt, beschrieben (Im *et al.* 2000). Eine Dekade später wurde auch die Kristallstruktur von S1P<sub>1</sub> entschlüsselt (Parrill *et al.* 2012; Hanson und Peach 2014).

Die fünf S1P-Rezeptoren unterscheiden sich nicht nur in ihrem Expressionsmuster, welches abhängig von Gewebe und Zelltyp ist, sondern auch durch die Kopplung an unterschiedliche G-Proteine (Spiegel und Milstien 2003). Bis heute wurden in etlichen Arbeiten die Funktionen und Veränderungen von Sphingolipiden bei bestimmten Krankheiten untersucht und dennoch sind viele Fragen bisher ungeklärt. In meiner Arbeit wird nun konkret die Rolle von S1P<sub>5</sub> und sehr langkettigen Ceramiden im Kontext von fibrotischen Veränderungen in der Niere untersucht.

### 1.3.2 Metabolismus

Die *de novo*-Synthese von Sphingolipiden erfolgt aus der Kondensationsreaktion von Serin und Palmitoyl-CoA, welche von der Serin-Palmitoyltransferase katalysiert wird (Huwiler und Pfeilschifter 2018). Das entstandene 3-Keto-Dihydrosphingosin wird anschließend mit Hilfe der 3-Keto-Dihydrosphingosin-Reduktase zu Dihydrosphingosin (auch Sphinganin genannt) reduziert (Abbildung 4).

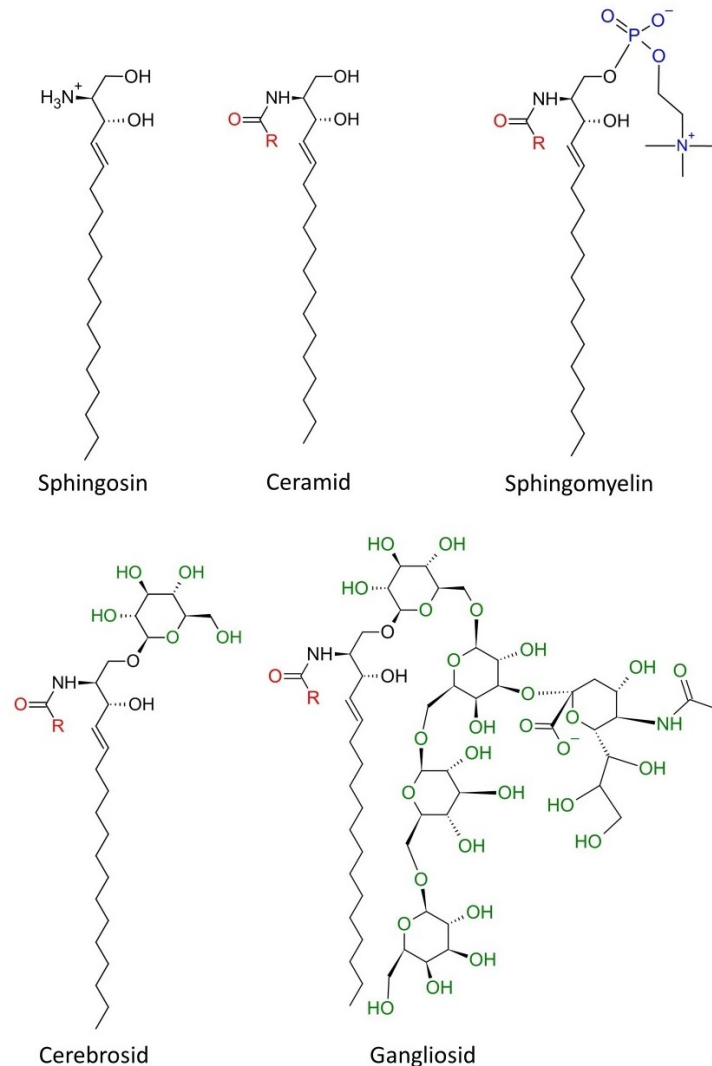


**Abbildung 4: Übersicht über die Lokalisation und Stoffwechselwege der Sphingolipide inklusive der beteiligten Enzyme in den verschiedenen Zellkompartimenten.** Die *de novo*-Synthese der Sphingolipide einschließlich der Verstoffwechslung hin zu Ceramiden (Cer) und S1P erfolgt im ER. S1P kann dort irreversibel degradiert werden oder aber in den Zellkern wandern und dort die Transkription beeinflussen. Cer werden zum Golgi-Apparat transportiert und dort in Sphingomyelin (SM) umgewandelt. SM erreicht über vesikulären Transport die Zellmembran und kann dort über Cer wieder zu Sphingosin (Sph) abgebaut werden. Sphingosinkinasen in der Plasmamembran (PM) können Sph zu S1P umwandeln, welches mittels aktiven Transports durch die PM aus der Zelle geschleust werden kann, um extrazelluläre S1P-Rezeptoren zu aktivieren. Über Endozytose sind Sphingolipide auch im Lysosom vertreten und können dort ebenfalls weiter verstoffwechselt werden (Abb. von Huwiler und Pfeilschifter 2018).

Diese Katalyse findet auf der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. An das Sphinganin kann nun ein Fettsäurerest mit einer Kettenlänge von 14 bis 26 Kohlenstoffatomen geknüpft werden. Die Wahl des Acyl-CoA-Substrats wird durch die Ceramidsynthasen vorgegeben. Die sechs verschiedenen Ceramidsynthasen unterscheiden sich in ihrer Präferenz für Substrate mit bestimmter Kettenlänge und in ihrem Expressionsmuster. Das entstandene Dihydroceramid kann entweder wieder zu Sphinganin und einem Fettsäurerest von einer Ceramidase gespalten werden oder aber durch die Desaturase zu Ceramid reduziert werden.

Vom ER aus können die Ceramide ohne Hilfe von Vesikeln über das Ceramidtransferprotein (CERT) zum Golgi-Apparat transportiert werden (Hanada *et al.* 2003). Dort angekommen können die Ceramide mit einem oder mehreren Zuckerresten verknüpft werden, um komplexe Sphingolipide wie Cerebroside und Ganglioside zu bilden (Abbildung 5). Ceramide können aber auch mit Hilfe der Sphingomyelinsynthase durch das Verestern mit Phosphocholin oder Phosphoethanolamin zu Sphingomyelinen metabolisiert werden (Abbildung 5). Die Rückreaktion kann durch die saure, alkalische oder neutrale Sphingomyelinase katalysiert werden. Diese Enzyme sind in bestimmten Zellkompartimenten, wie der Plasmamembran oder Lysosomen zu finden. Sphingomyelin und komplexe Sphingolipide können über vesikulären Transport die Plasmamembran und auch die Lysosomen erreichen. Sphingomyelin ist das am häufigsten vorkommende Sphingolipid und bildet einen großen Anteil an den Lipiden der Plasmamembran. Über den sogenannten *salvage pathway* kann Ceramid mit Hilfe der Ceramidase wieder zu einer Fettsäure und Sphingosin hydrolysiert werden. Darüber hinaus kann Sphingosin über die zwei Sphingosinkinassen 1 und 2 (SK-1 und SK-2) zu Sphingosin-1-Phosphat phosphoryliert werden. Die Rückreaktion kann durch die S1P-Phosphatasen 1 und 2 oder anderen Phosphatidat-Phosphatasen katalysiert werden. S1P kann jedoch auch irreversibel mit Hilfe der S1P-Lyase zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin abgebaut werden. S1P ist ein bedeutendes Molekül der Sphingolipide und gilt als bioaktiver Lipidmediator, da es zahlreiche Signalwege aktivieren, Zellmigration steuern und die Genexpression beeinflussen kann.





**Abbildung 5: Strukturformeln der wichtigsten Vertreter der Sphingolipide.** Das Grundgerüst der Sphingolipide bildet der einfach ungesättigte Aminoalkohol Sphingosin, welcher aus einer langen Kohlenwasserstoffkette aus 18 C-Atomen und einem polaren Kopf, gebildet von einer Amino- und zwei Hydroxygruppen, besteht. Durch die Kondensation mit einer Fettsäure kann eine Carbonsäureamidbindung ausgebildet werden. Die entstandenen Moleküle werden Ceramide genannt. An die primäre Hydroxygruppe des Sphingosinrückgrats können eine Phosphocholin- oder Phosphoethanolamingruppe geknüpft werden, wodurch Sphingomyeline entstehen. Es finden sich aber auch Verbindungen mit einzelnen Zuckern oder Oligosacchariden zur Bildung von Cerebrosiden bzw. Gangliosiden.

### 1.3.3 Sphingosinkinase-1 und Sphingosinkinase-2

S1P wird aus Sphingosin durch eine enzymatisch katalysierte Phosphorylierung auf der zytosolischen Seite der Zellmembran gebildet und kann aufgrund des geladenen Phosphatrests nur mit Hilfe von Transportproteinen die Zellmembran passieren

(Maceyka *et al.* 2012). Es gibt zwei verschiedene, ubiquitär exprimierte Isoformen der Sphingosinkinase, SK-1 und SK-2, die S1P bilden können und durch verschiedene Stimuli in ihrer Expression und Aktivierung gesteuert werden (Alemany *et al.* 2007). Die Synthese von S1P ist essentiell für die Entwicklung, weshalb der simultane Knockout beider Enzyme zu schweren Defekten in der Neurogenese und Angiogenese führt und bereits embryonal letal ist (Mizugishi *et al.* 2005). Wurde jedoch nur eine der beiden Sphingosinkinasen ausgeschaltet, zeigten Knockout-Mäuse keinen auffälligen Phänotyp. Trotz dieser Eigenschaft sich gegenseitig kompensieren zu können, weisen die beiden Isoformen jedoch Unterschiede auf, was die Gewebeexpression, zelluläre Lokalisation und Auswirkungen ihrer Aktivität auf die Zelle betrifft. So findet sich die SK-1 im Zytoplasma und transloziert nach Aktivierung zur Plasmamembran, wohingegen die SK-2 auch im Zellkern aktiv ist (Igarashi *et al.* 2003; Jarman *et al.* 2010). Es wurde beobachtet, dass die Aktivierung der SK-1 Zellproliferation und Migration bewirkt und Apoptose verhindert, wodurch Tumorzellen in ihrem Wachstum begünstigt wurden (Olivera *et al.* 1999; Xia *et al.* 2000; Edsall *et al.* 2001). Die Rolle der SK-2 ist hingegen nicht eindeutig geklärt. Einige Studien zeigten, dass die Aktivität der SK-2 die Zellproliferation inhibierte und über einen S1P-Rezeptor-unabhängigen Weg die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und folglich Apoptose auslöste (Liu *et al.* 2003; Igarashi *et al.* 2003). Andere Studien fanden jedoch heraus, dass ein Knockdown von SK-2 Apoptose auch induzieren und das Wachstum von Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bremsen kann (Van Brocklyn *et al.* 2005; Weigert *et al.* 2009; Neubauer *et al.* 2016).

Beide Enzyme werden besonders stark in menschlichen Nieren exprimiert (Liu *et al.* 2000; Nava *et al.* 2000). Auch in der Niere wurden gegensätzliche Funktionen der beiden SKs in Bezug auf den Verlauf von renaler Fibrose in Mausmodellen beobachtet. So führte ein Knockout von SK-1 zu einem schwereren Krankheitsverlauf der Fibrose, wohingegen ein Knockout von SK-2 fibrotische Prozesse bremste (Ren *et al.* 2009; Du *et al.* 2017; Schwalm *et al.* 2017).

Da beide Enzyme dasselbe Substrat verwenden und das gleiche Produkt erzeugen, ist für die Funktion wohl entscheidend, an welchem Ort in der Zelle S1P gebildet wird. So wurde in mehreren Studien beobachtet, dass S1P nicht nur über die S1P-Rezeptoren auf der Außenseite der Plasmamembran sondern auch über intrazelluläre

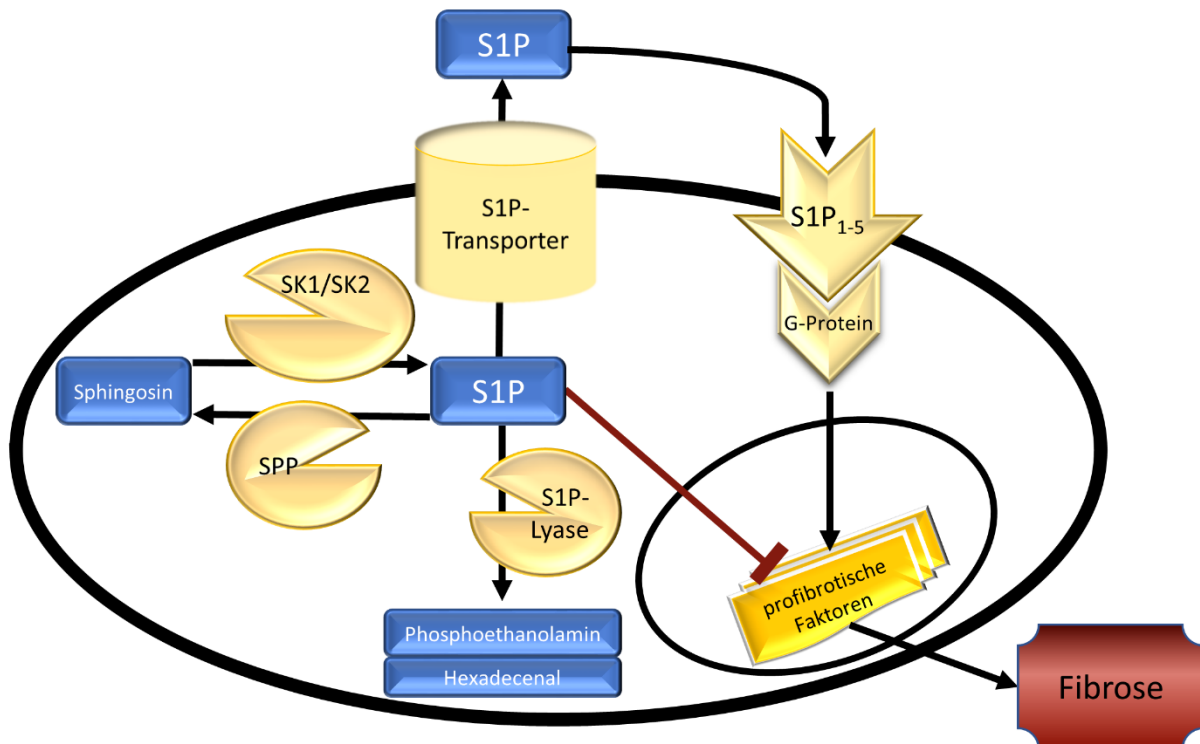
Zielstrukturen die Genexpression einer Zelle steuern kann (Spiegel und Milstien 2000; Takabe *et al.* 2008). Auch im Hinblick auf fibrotische Prozesse in renalen Zellen wurden gegensätzliche Effekte von S1P, abhängig davon, ob es extrazellulär oder intrazellulär aktiv war, beobachtet (Koch *et al.* 2013; Schwalm *et al.* 2013). So stellte sich heraus, dass extrazelluläres S1P über die Aktivierung von S1P-Rezeptoren die Expression von profibrotischen Zytokinen wie *connective tissue growth factor* (CTGF) und Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagene induziert, aber intrazellulär gebildetes S1P deren Expression hemmt (Ren *et al.* 2009; Blanchard *et al.* 2018) (Abbildung 6).

### 1.3.4 Der S1P-Transporter Spinster Homolog 2 (Spns2)

Aufgrund der polaren Kopfgruppe des S1P kann dieses Molekül nur mit Hilfe eines aktiven Transporters die Plasmamembran überwinden. Für den Export von S1P aus Erythrozyten und Thrombozyten wurde der Transporter *major facilitator superfamily transporter 2b* (Mfsd2b) identifiziert, dessen Knockout in Mäusen eine Reduktion von S1P im Plasma von ca. 50% bewirkte (Vu *et al.* 2017). In mehreren Studien wurde auch bereits gezeigt, dass manche ABC-Transporter wie *multidrug resistance-associated protein* (MRP1/ABCC1) S1P transportieren und somit Einfluss auf S1P-vermittelte Prozesse nehmen können (Mitra *et al.* 2006; Nieuwenhuis *et al.* 2009; Cartwright *et al.* 2013; Yamada *et al.* 2018). Der prominenteste Vertreter der S1P-Transporter ist Spinster homolog 2, kurz Spns2. Es wurde gezeigt, dass dieser S1P-Transporter verantwortlich für den Export von S1P aus Endothelzellen ist, was aber nicht immer auch die Konzentrationen von S1P im Plasma und in der Lymphe veränderte, jedoch stets zu einer Lymphopenie führte (Hisano *et al.* 2011; Mendoza *et al.* 2012; Nagahashi *et al.* 2013; Donoviel *et al.* 2015).

Spns2 ist ein multitransmembrängängiges Transportprotein in Säugetieren, welches zur Familie der Spinster (Spns1 bis Spns3 in Wirbeltieren und Spinster in *Drosophila*) gehört (Osborne *et al.* 2008; Nishi *et al.* 2014). Entdeckt wurde Spinster in *Drosophila melanogaster*, wo seine Mutation in weiblichen Fliegen zum namensgebenden Desinteresse an Männchen führte (*spinster* = Jungfer) (Nakano *et al.* 2001).

Die funktionelle Bedeutung von Spns2 für den Transport von S1P wurde durch Spns2-defiziente Zebrafische bekannt, welche einen ähnlichen Phänotyp wie S1P<sub>2</sub>-defiziente Fische aufwiesen. In beiden Linien führte das Ausschalten des Gens zu einem gespaltenen Herzen, da die Migration von Herzvorläuferzellen inhibiert war (Osborne *et al.* 2008; Kawahara *et al.* 2009). Die Zugabe von exogenem S1P oder die Expression von humanem Spns2 konnte die Spns2-Defizienz kompensieren und eine normale Herzentwicklung sicherstellen (Kawahara *et al.* 2009). Neben S1P kann Spns2 auch dihydro-S1P und phosphoryliertes FTY720 (Fingolimod) transportieren (Hisano *et al.* 2011; Nagahashi *et al.* 2013). Spns2<sup>-/-</sup>-Mäuse hingegen leiden nicht unter Defekten am Herz und entwickeln sich normal und sind fertil (Chen *et al.* 2014). Phänotypisch können diese Mäuse eine postnatale Hörschädigung und eine Fehlbildung der Augen entwickeln (Chen *et al.* 2014). Die Hörschädigung der Mäuse in der Studie von Chen *et al.* (2014) war unter anderem bedingt durch ein rapide abgesunkenes endocochleäres Potential und einer Degeneration der Haarsinneszellen aufgrund unzureichender Expression von Schlüsselproteinen wie Kcnj10, Kcnq1, Gjb2 und Gjb6. Die Defekte der Augen zeigten sich durch geöffnete Augenlider bei der Geburt, einer Degeneration der Netzhaut, gestörter Vaskularisation der Netzhaut und einer getrübten Hornhaut. Sowohl der Effekt im Gehör als auch in den Augen war nicht durch eine systemische Spns2-Defizienz bedingt, sondern ein lokales Phänomen, wie durch gewebespezifische Spns2<sup>-/-</sup>-Mäuse gezeigt werden konnte. Die Defekte der Netzhaut konnten zudem auch in Spns2<sup>-/-</sup>-Sprague-Dawley-Ratten beobachtet werden und wurden einer fehlenden S1P<sub>3</sub>-Aktivierung zugeschrieben (Fang *et al.* 2018).



**Abbildung 6: Schema des Metabolismus von S1P und der direkte Einfluss auf renale Fibrose.** In den blauen Kästen stehen die Namen der Metabolite und in den gelben Kästen die der Enzyme, Transporter und Rezeptoren. Die Sphingosinkinasen (SK-1/SK-2) katalysieren die Phosphorylierung von Sphingosin auf cytosolischer Seite. Die Dephosphorylierung von S1P wird katalysiert von den S1P-Phosphatasen (SPP). S1P kann irreversibel von der S1P-Lyase zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin abgebaut werden. Über S1P-Transporter wie Spns2 kann S1P aktiv über die Plasmamembran transportiert werden und autokrin und/oder parakrin S1P-Rezeptoren aktivieren. Die gekoppelten G-Proteine aktivieren unterschiedliche Signalkaskaden, die zur Expression von profibrotischen Faktoren führen können. Auf intrazellulärer Seite kann S1P jedoch die Expression von profibrotischen Faktoren blockieren.

Um die profibrotischen S1P-Rezeptor-vermittelten Effekte von S1P zu unterbinden, können zum einen die S1P-Transportproteine oder aber die S1P-Rezeptoren genetisch oder pharmakologisch manipuliert werden. So wurde bereits anhand eines Mausmodells zum Ischämie-Reperfusionsschaden in der Niere gezeigt, dass die Aktivierung von S1P<sub>2</sub> Apoptose und Nekrose der Nierenzellen induzierte, die Inhibierung dieses Rezeptors mittels des S1P<sub>2</sub>-selektiven Antagonisten JTE-013 jedoch den Schaden in der Niere milderte (Won Park *et al.* 2012).

### 1.3.5 Die S1P-Rezeptoren

Es sind insgesamt fünf S1P-Rezeptoren bekannt, die sich funktional vor allem in ihrer Gewebeexpression und auch teilweise durch die unterschiedlichen gekoppelten G-Proteine voneinander differenzieren lassen (Brinkmann 2007). Die Aktivierung der G-Proteine führt in den verschiedenen Geweben zur Aktivierung oder Inhibierung verschiedener Signalwege, welche sich letztlich auf zelluläre Schlüsselprozesse wie Proliferation, Migration und Überleben auswirken können und die Calciumhomöostase, die Vasokonstriktion und auch die Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix steuern können (Abbildung 7) (Nagahashi *et al.* 2014).

S1P<sub>1</sub> ist im Menschen ubiquitär exprimiert, was sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in etlichen Geweben nachgewiesen worden ist (Uhlén *et al.* 2015; Uhlén *et al.* 2019a; Uhlén *et al.* 2019b; Sjöstedt *et al.* 2020). S1P<sub>1</sub> ist als einziger S1P-Rezeptor ausschließlich an G<sub>i/o</sub> gekoppelt (Windh *et al.* 1999) (Abbildung 7). Es handelt sich hierbei um den am besten charakterisierten und bisher auch einzigen S1P-Rezeptor, dessen Aktivierung/Inhibition gezielt zur Behandlung bestimmter Patientengruppen therapeutisch genutzt wird. So sind zum einen der unspezifische Agonist FTY720 (Fingolimod, Gilenya<sup>®</sup>, bindet alle S1P-Rezeptoren bis auf S1P<sub>2</sub>) und der S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>5</sub>-spezifische Agonist BAF312 (Siponimod, Mayzent<sup>®</sup>) zur Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose zugelassen (Sharma *et al.* 2011; Al-Salama 2019). Die beiden Agonisten sorgen für eine Internalisierung mit anschließendem proteasomalen Abbau von S1P<sub>1</sub> und werden konstant in so hoher Dosis appliziert, dass sie funktionell als Antagonisten wirken, da der Rezeptor folglich nicht mehr in ausreichender Menge an der Zelloberfläche zur Bindung von S1P zur Verfügung steht (Brinkmann *et al.* 2004; Matloubian *et al.* 2004; Chun und Hartung 2010). Der Benefit der Inhibierung von S1P<sub>1</sub> liegt darin, dass T-Zellen über S1P<sub>1</sub> dem S1P-Gradienten zwischen Lymphe, Blut und Gewebe folgen und ohne den Rezeptor der Austritt dieser Immunzellen aus den Lymphknoten verhindert wird, was folglich in einer peripheren Lymphopenie mündet (Yanagawa *et al.* 1998). Ein Knockout von S1P<sub>1</sub> in Mäusen führt zu embryonal letalen Blutungen, da er eine wichtige Rolle bei der Gefäßreifung und der Ummantelung der Gefäße mit glatten Muskelzellen im Rahmen der Vaskulogenese inne hat (Liu *et al.* 2000).

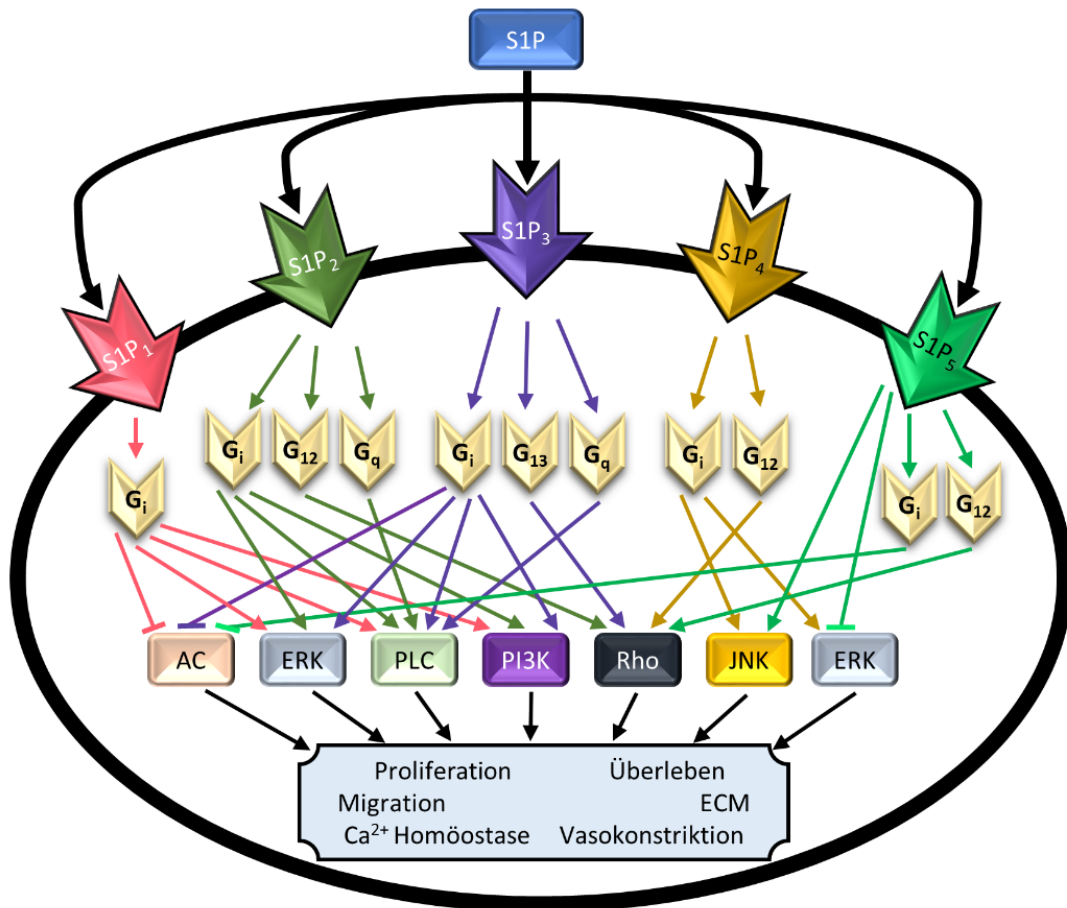
S1P<sub>2</sub> wird ebenfalls ubiquitär exprimiert und ist neben G<sub>i/o</sub> auch noch an G<sub>12</sub> und G<sub>q</sub> gekoppelt (Windh *et al.* 1999) (Abbildung 7). Die mRNA-Expression ist im Menschen besonders stark in den Geschlechtsorganen beider Geschlechter, im Blut, im Knochenmark, im lymphatischen System, im Fettgewebe und in der Lunge ausgeprägt und auf Proteinebene wurde die Expression in den Nieren, im Duodenum und im Dünndarm nachgewiesen (Uhlén *et al.* 2015; Uhlén *et al.* 2019a; Uhlén *et al.* 2019b; Sjöstedt *et al.* 2020). Knockout von S1P<sub>2</sub> in Mäusen ist zunächst phänotypisch unauffällig, führt aber zu neuronalen Fehlfunktionen, die tödliche Krämpfe zur Folge haben können (MacLennan *et al.* 2001). Des Weiteren wurden bei 30 Tage alten Mäusen Läsionen in der Stria vascularis gefunden, die zur Taubheit führten (Kono *et al.* 2007). Auf zellulärer Ebene wurde festgestellt, dass die Aktivierung von S1P<sub>2</sub> die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern auslöst, was zur Kontraktion von glatten Muskelzellen führt (Ohmori *et al.* 2003; Kendig *et al.* 2013). Außerdem wurde bei der Untersuchung von malignen Gliazellen festgestellt, dass die Aktivierung von S1P<sub>2</sub> die Zellmigration inhibiert (Lepley *et al.* 2005; Young und Van Brocklyn 2007; Malchinkhuu *et al.* 2008).

S1P<sub>3</sub>-mRNA wird ubiquitär im Menschen exprimiert und ist in besonders hohen Mengen in den Geschlechtsorganen beider Geschlechter, im Muskelgewebe und Organen des endokrinen Systems zu finden (Uhlén *et al.* 2015; Uhlén *et al.* 2019a; Uhlén *et al.* 2019b; Sjöstedt *et al.* 2020). S1P<sub>3</sub> ist an G<sub>i/o</sub>, an G<sub>13</sub> und G<sub>q</sub> gekoppelt und Knockout-Mäuse weisen keinen auffälligen Phänotyp auf (Abbildung 7). Anhand isolierter Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass der S1P-induzierte PLC/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> Signalweg gestört ist (Windh *et al.* 1999; Ishii *et al.* 2001). Die Aktivierung von S1P<sub>3</sub> induziert in verschiedenen Zelltypen die Migration (Okamoto *et al.* 2000; Paik *et al.* 2001).

S1P<sub>4</sub>-mRNA wird im Menschen hauptsächlich im Blut (alle Zelltypen), im Knochenmark, im lymphatischen System, in der Lunge und dem Verdauungstrakt exprimiert (Uhlén *et al.* 2015; Uhlén *et al.* 2019a; Uhlén *et al.* 2019b; Sjöstedt *et al.* 2020). S1P<sub>4</sub> ist an G<sub>i/o</sub> und an G<sub>12/13</sub> gekoppelt (Abbildung 7). Knockout-Mäuse zeigen keinen besonderen Phänotyp, weisen aber eine gestörte Ausbildung der Megakaryozyten auf (Gräler *et al.* 1998; Gräler *et al.* 2003; Golfier *et al.* 2010).

S1P<sub>5</sub>-mRNA wird im Menschen am häufigsten im Blut, im Gehirn, im Knochenmark, im lymphatischen System und in der Haut exprimiert und konnte auf Proteinebene bereits im Gehirn, in der Haut, in der Lunge und in verschiedenen lymphatischen Geweben nachgewiesen werden (Uhlén *et al.* 2015; Uhlén *et al.* 2019a; Uhlén *et al.* 2019b; Sjöstedt *et al.* 2020). S1P<sub>5</sub> ist an G<sub>i/o</sub> und an G<sub>12/13</sub> gekoppelt (Im *et al.* 2000) (Abbildung 7). S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp, besitzen jedoch weniger periphere natürliche Killerzellen und Ly6C<sup>+</sup>-Monozyten (Jenne *et al.* 2009; Debien *et al.* 2013). Die essentielle Rolle von S1P<sub>5</sub> für die Migration der natürlichen Killerzellen konnte in weiteren Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* belegt werden (Walzer *et al.* 2007; Mayol *et al.* 2011; Drouillard *et al.* 2018). Des Weiteren wurde darüber berichtet, dass S1P<sub>5</sub> eine Rolle bei der Phagozytose von alveolaren Makrophagen und bei der Autophagie der humanen Prostatakrebszelllinie PC-3 spielt (Chang *et al.* 2009; Barnawi *et al.* 2015). Alveolare Makrophagen von Patienten, die an chronisch obstruktiver Lungenerkrankung litten, zeigten eine signifikant erhöhte Genexpression von S1P<sub>5</sub> und eine Antagonisierung von S1P<sub>5</sub> über den S1P<sub>3</sub>- und S1P<sub>5</sub>-spezifischen Rezeptorantagonisten Suramin führte zu einer Verbesserung der Phagozytose in alveolaren Makrophagen (Barnawi *et al.* 2015; 2017). In einer anderen Studie wurde eine weitere Rolle von S1P in Bezug auf die Migration und Proliferation von Tumorzellen entdeckt. Zhou *et al.* konnten in einem Mausmodell für Darmkrebs zeigen, dass die Herunterregulation von S1P<sub>5</sub> die Tumorgroße reduzierte und eine Hochregulation von S1P<sub>5</sub> das Tumorstadium förderte (Zhou *et al.* 2020). Eine Untersuchung *in vitro* mit den kolorektalen Tumorzelllinien SW480 und SW620 ergab, dass die Herunterregulation von S1P<sub>5</sub> die Migration und Proliferation der Zellen über die Inhibierung von NF-κB reduzierte (Zhou *et al.* 2020).





**Abbildung 7: Schema der S1P-Rezeptoren und der gekoppelten G-Proteine sowie deren Einfluss auf nachgeschaltete Signalwege.** S1P bindet die S1P-Rezeptoren in der Plasmamembran, was die Aktivierung der gekoppelten G-Proteine initiiert. Die S1P-Rezeptoren sind an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt, was zur Aktivierung oder Inhibierung verschiedener Signalwege führen kann, von denen einige hier abgebildet sind. Die Signaltransduktionen lösen in der Zelle Schlüsselprozesse wie Proliferation, Migration, Überleben und auch die Expression von Proteinen des Bindegewebes aus. AC: Adenylylcyclase; ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; PLC: Phospholipase C; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen; Rho: Rho-GTPasen; JNK: c-Jun N-terminale Kinasen; ECM: extrazelluläre Matrix (Abb. nach Vorlage von Nagahashi *et al.* 2014).

### 1.3.6 Die Rolle der S1P-Rezeptoren bei renaler Fibrose

Die Aktivierung von S1P-Rezeptoren kann in der Zelle eine Vielzahl verschiedener Effekte, wie zum Beispiel Proliferation, Synthese von extrazellulärer Matrix und Migration vermitteln und so den Krankheitsverlauf verschiedener Patientengruppen beeinflussen. Das prominenteste Beispiel eines solchen S1P-Rezeptormodulators ist das *prodrug* Fingolimod, welches bereits im Abschnitt 1.3.5 beschrieben wurde.

Neben Multipler Sklerose gibt es hingegen auch noch andere Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel den systemischen Lupus erythematoses (SLE) bei dem, abhängig vom ethnischen Hintergrund, 30-80% der Patienten eine Nephritis entwickeln (Imran *et al.* 2016; Rees *et al.* 2017). Diese sogenannte Lupus-Nephritis (LN) führt nicht selten zur CKD, welche in ESRD enden kann (Almaani *et al.* 2017). Anhand verschiedener Studien zur experimentellen SLE mit Hilfe von BXSB, NZB/W F1 und MRL-lpr/lpr Mäusen konnte eine Verbesserung des Krankheitsbildes, einschließlich einer verbesserten Nierenfunktion, durch die Behandlung mit Fingolimod bestätigt werden (Okazaki *et al.* 2002; Alperovich *et al.* 2007; Ando *et al.* 2010). Aktuell befindet sich der S1P<sub>1</sub>-selektive Modulator Cenerimod, der ebenfalls eine schützende immunsupprimierende Wirkung ausübt, in Phase 2 einer klinischen Studie zur Behandlung von SLE-Patienten (Hermann *et al.* 2019; Lott *et al.* 2020).

Darüber hinaus wurden die Auswirkungen von Fingolimod auch in anderen Tiermodellen zu Nephropathien untersucht, welche nicht durch eine Autoimmunität verursacht werden. Es wurde herausgefunden, dass Fingolimod den Krankheitsverlauf bei Ratten mit einer Thy1.1-induzierten mesangioproliferativen Glomerulonephritis, mit antikörperinduzierter membranöser Glomerulonephritis, mit Adriamycin-induzierter Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose, mit Albuminüberschuss-induzierter als auch mit 5/6-Nephrektomie-induzierter tubulointerstitieller Fibrose und mit Streptozotizin-induzierter DN verbessert (Peters *et al.* 2004; Martini *et al.* 2007; Awad *et al.* 2011; Sui *et al.* 2012; Ni *et al.* 2013; Xu *et al.* 2014; Yazdani *et al.* 2015). In Untersuchungen zur tubulointerstitiellen Fibrose, hervorgerufen durch UUO und auch bei akutem Nierenschaden induziert durch einen Ischämie-Reperfusionsschaden oder Cisplatin, konnte ebenso eine Milderung des Nierenschadens in Mäusen durch

Behandlung mit Fingolimod erreicht werden (Bajwa *et al.* 2010; Shobha *et al.* 2014; Bajwa *et al.* 2015).

S1P<sub>3</sub>-defiziente Mäuse zeigten in zwei Studien einen milderen Krankheitsverlauf im Modell des Ischämie-Reperfusionsschadens, dessen Ursache Bajwa *et al.* in einer inhibierten Reifung von dendritischen Zellen und einer folgenden Hochregulation von regulatorischen T-Zellen sahen (Jo *et al.* 2009; Bajwa *et al.* 2016). In einem Modell zur Streptozotizin-induzierten DN zeigten S1P<sub>3</sub>-defiziente Mäuse jedoch keinen Unterschied in der Albuminurie im Vergleich zu Kontrollmäusen und die Behandlung von Fingolimod führte auch in S1P<sub>3</sub>-defizienten Mäusen zu einem Behandlungserfolg, was für einen S1P<sub>3</sub>-unabhängigen Mechanismus spricht (Awad *et al.* 2011).

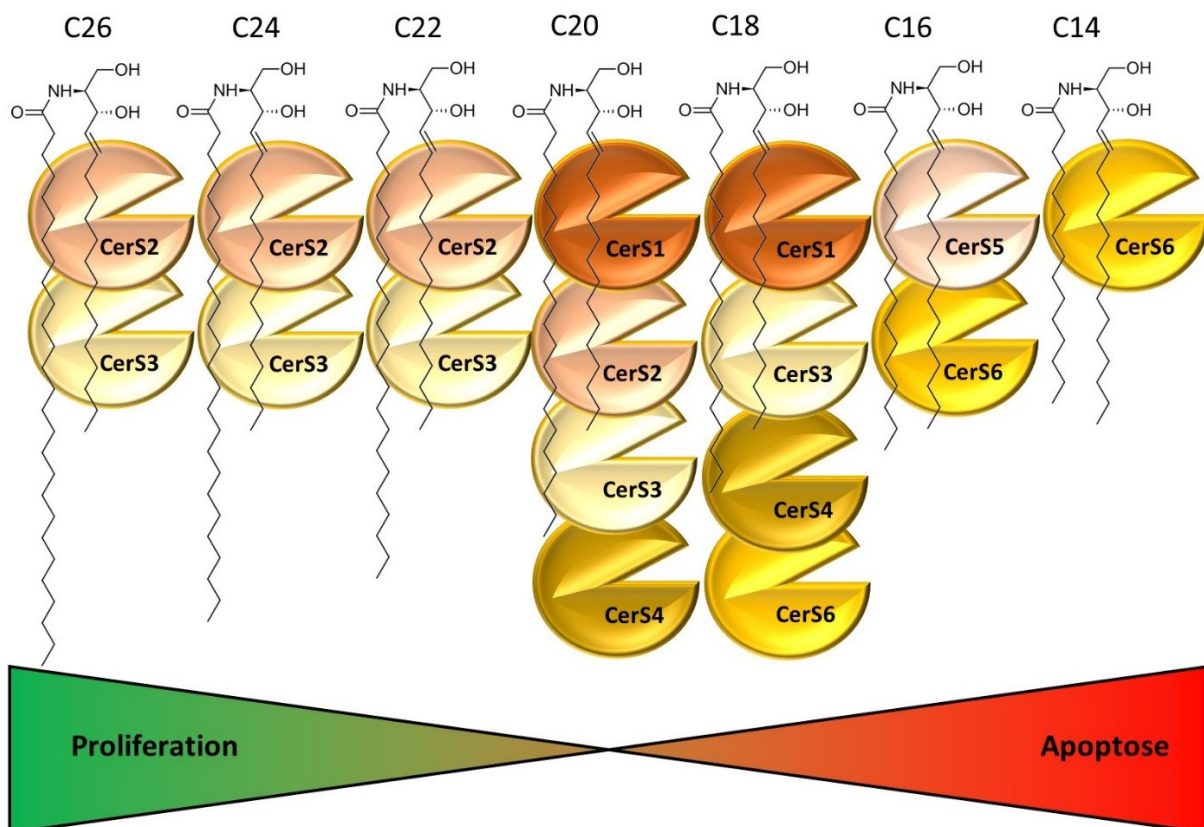
Obwohl Fingolimod nicht an S1P<sub>2</sub> bindet und die beschriebene protektive Wirkung dieses Medikaments bei den verschiedenen *in vivo*-Modellen daher S1P<sub>2</sub>-unabhängig sein müsste, wurde dennoch *in vitro* unter Verwendung von renalen Zellen eine profibrotische Wirkung dieses Rezeptors entdeckt (Li *et al.* 2008; Ishizawa *et al.* 2014). In Tiermodellen zur Untersuchung von Leberfibrose wurde bestätigt, dass S1P<sub>2</sub> die Entstehung einer Fibrose fördert, weshalb von einer ähnlichen Wirkung in einem Modell zur Nierenfibrose ausgegangen werden kann (Serriere-Lanneau *et al.* 2007; Ikeda *et al.* 2009).

Zusammengefasst wird deutlich, dass die den S1P-Rezeptoren nachgeschalteten Signalwege einen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf von verschiedenen Nierenerkrankungen ausüben. In der vorliegenden Arbeit wurde speziell der Einfluss von S1P<sub>5</sub> auf die Entzündungsreaktionen und die Ausbildung einer Nierenfibrose durch eine Adenin-induzierte Nephropathie (AN) untersucht.

### 1.3.7 Ceramide

Ceramide sind ein Bestandteil der eukaryotischen Zellmembranen und zentrale Moleküle des Sphingolipidstoffwechsels. An der Synthese und der Degradation der Ceramide sind zahlreiche Enzyme involviert (Hannun und Obeid 2018). Ceramide können entweder *de novo* ausgehend von Serin und Palmityl-CoA, durch die Spaltung von Sphingomyelin oder über den *salvage pathway* aus Sphingosin und Acyl-CoA

gebildet werden. Neben Sphingomyelin können Ceramide auch zu den komplexeren Cerebrosiden und Gangliosiden modifiziert, zu Sphingosin abgebaut oder zu Ceramid-1-Phosphat metabolisiert werden (Hannun und Obeid 2018). Eine besondere Rolle spielen zudem die sechs Ceramidsynthasen (CerS1-6), die durch ihre unterschiedliche Substratspezifität zur Diversität der Ceramide beitragen. Die verschiedenen Isoformen der Ceramidsynthasen bevorzugen Acyl-CoA-Moleküle mit jeweils unterschiedlicher Kettenlänge, was zur Synthese von Ceramiden mit unterschiedlich langen Fettsäureresten führt (C14 bis C26) (Levy und Futerman 2010). Eine entscheidende Form der Steuerung dieses Prozesses geschieht schon durch die stark variable Expression der Ceramidsynthasen in den verschiedenen Geweben. So wird beispielsweise in der Niere hauptsächlich CerS2 exprimiert, im Herzen CerS4 und in den Hoden CerS3 (Grösch *et al.* 2012).



**Abbildung 8: Die Substratspezifität der sechs bekannten Ceramidsynthasen.** Die Ceramidsynthasen katalysieren die Acylierung von Sphingosin oder Sphinganin mit einer aktivierten Fettsäure unterschiedlicher Kettenlänge, aus denen die verschiedenen Ceramide bzw. Dihydroceramide gebildet werden (Levy und Futerman 2010a). Mehrheitlich wirken sehr langkettige Ceramide proliferativ, wohingegen kurzkettige und langkettige Ceramide proapoptotische Effekte zeigen (Mesicek *et al.* 2010; Siskind *et al.* 2010; Hartmann *et al.* 2013; Stiban und Perera 2015).

Die unterschiedliche Kettenlänge der Ceramide wirkt sich biophysikalisch auf die Membranfluidität aus. Sie können sich zu Plattformen zusammenschließen und Einfluss auf die Proteine in der Zellmembran, wie zum Beispiel Rezeptoren, nehmen oder Ceramidkanäle in mitochondrieller Membran ausbilden und dadurch Apoptose induzieren (Bollinger *et al.* 2005; Siskind *et al.* 2006).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass Ceramide in massenspektrometrisch gut messbaren Mengen im Blutplasma vorhanden und resistent gegenüber klinischen Störfaktoren sind, weshalb kettenlängenspezifische Ceramide attraktive Kandidaten für Biomarker von Krankheiten sein können (Brunkhorst *et al.* 2018). Es wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass, neben anderen Sphingolipiden, Ceramide im Plasma und Serum von Patienten, die an bestimmten Krankheiten wie zum Beispiel Leberzellkarzinom, Bluthochdruck und Typ 2 Diabetes leiden, erhöht sind (Haus *et al.* 2009; Grammatikos *et al.* 2016). Des Weiteren könnten Ceramide im Plasma auch bei der Diagnose von Herz-Kreislaufstörungen helfen, da gezeigt wurde, dass ein Anstieg von bestimmten Ceramiden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein unerwünschtes vaskuläres Ereignis wie ein Herzinfarkt oder Schlaganfall assoziiert war (Havulinna *et al.* 2016; Meeusen *et al.* 2018).

Auch im Zusammenhang mit verschiedenen Nierenerkrankungen wurden bereits Studien über Sphingolipide im Blut als Biomarker veröffentlicht. Im Fokus dieser Studien stand meistens die Veränderung von S1P im Plasma von Patienten, die an DN oder LN leiden (Watson *et al.* 2012; Bekpinar *et al.* 2015; Sun *et al.* 2017). Mittels LC-ESI-MS/MS Analyse konnte zuletzt durch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bestimmte sehr langkettige Ceramide wie Cer d18:1/24:1 im Plasma und Serum von LN-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Patienten, die an SLE ohne Nierenbeteiligung leiden, erhöht sind (Patyna *et al.* 2019). Die Gruppe um Nowling *et al.* untersuchte zudem Nierengewebe von Patienten und Mäusen, die an LN litten und konnte zeigen, dass Glycosphingolipide, insbesondere Lactosylceramide, im Vergleich zu gesunden Gewebeproben verändert waren (Nowling *et al.* 2015).

In der vorliegenden Arbeit haben wir nun die Veränderungen der Ceramide im Nierengewebe unter dem Einfluss der renalen Fibrose untersucht. Konkret haben wir Nierenbiopsien von Patienten, die an Hydronephrose und/oder Pyelonephritis als auch von Mäusen, die an AN litten, analysiert. Als gesunde Kontrollen dienten Biopsien von Patienten, die ein Nierentrauma erlitten haben oder an Nierenkrebs erkrankten, bzw. gesunde Mäuse.

## 1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle verschiedener Mediatoren des Sphingolipidstoffwechsels im Kontext fibrotischer Nierenerkrankungen untersucht werden. Insbesondere S1P spielt hierbei eine zentrale Rolle. Aus Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wissen wir, dass S1P über die Aktivierung der S1P-Rezeptoren die Expression des profibrotischen Zytokins CTGF induziert, während intrazelluläres S1P antifibrotische Effekte hervorruft. S1P<sub>5</sub> scheint hier, ausgehend von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, entscheidend an der Regulation der Expression von CTGF beteiligt zu sein. Neben S1P vermutet man, dass auch Ceramide eine wichtige Rolle bei der Progression fibrotischer Nierenerkrankungen spielen und zum Beispiel als Biomarker der LN eingesetzt werden könnten. Schließlich stellt sich auch die Frage, inwieweit die Regulation des Transports von S1P über die Zellmembran entscheidend für die Vermittlung der pro- und antifibrotischen Effekte von S1P ist.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in einem ersten Teilprojekt die Auswirkungen des S1P<sub>5</sub> in einem Modell zur tubulointerstitiellen Nierenfibrose bei der Maus auf entzündliche und fibrotische Prozesse untersucht. In einem zweiten Projekt wurde der Zusammenhang von Konzentrationsänderungen spezifischer Ceramide im Nierengewebe von Patienten und Mäusen mit fibrotischen Nieren im Vergleich zu gesunden Nierengeweben untersucht. Im dritten, hier vorgestellten, Projekt wurde die Rolle des S1P-Transporters Spns2 für die Expression von CTGF in Mesangiumzellen der Maus untersucht.

Insgesamt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, unser Verständnis für die Funktion einzelner Bausteine des komplexen Sphingolipidstoffwechsels bei der Entstehung der Nierenfibrose besser zu verstehen und so den Weg für neuartige Diagnose- und Therapiemöglichkeiten zu ebnen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

Zellen	Herkunft
Mesangiumzellen (mMC)	primär isolierte Zellen

Tabelle 1: Zellen

#### 2.1.2 Kulturmedien und Zusätze

Kulturmedium oder Zusatz	Hersteller
DMEM/F12 mit L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad
Dulbecco's PBS, -CaCl <sub>2</sub> , -MgCl <sub>2</sub> (DBPS)	
Trypsin/EDTA 0,05%	
DMEM, GlutaMAX™, + 4,5 g/L D-Glukose, - Pyruvat (DMEM)	
RPMI 1640, + GlutaMAX™	
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FKS)	
Bovines Serumalbumin (BSA, fettsäurefrei)	
Insulin	
HEPES solution, 1 M, pH 7.0-7.6	
β-Mercaptoethanol	
Transferrin	Roche Biochemicals, Mannheim

Tabelle 2: Kulturmedien und Zusätze



### 2.1.3 Zusammensetzung des Wachstumsmediums

Kulturmedium oder Zusatz	Anteil/Konzentration für Mesangiumzellen (Maus)
RPMI 1640, + GlutaMAX™	500 mL
Fetales Kälberserum (FKS)	15%
Penicillin-Streptomycin	10000 U/mL
HEPES solution (1 M)	10 mM
β-Mercaptoethanol (10 mM)	225 µL
Natriumselenit	5 ng/mL
Transferrin	5 µg/mL
Insulin	6 µg/mL
β-Mercaptoethanol	4,5 µg/mL

Tabelle 3: Zusammensetzung des Wachstumsmediums

### 2.1.4 Zusammensetzung anderer Medien

Kulturmedium oder Zusatz	Hungermedium	Stimulationsmedium
DMEM, GlutaMAX™	500 mL	500 mL
Fetales Kälberserum (FKS)	1%	
Bovines Serumalbumin (fettsäurefrei)		0,1%

Tabelle 4: Zusammensetzung anderer Medien

### 2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
PowerPac 200	BioRad, München, Deutschland
Elektrophoresekammer	
Filmentwickler, CP 1000	AGFA Healthcare, Bonn, Deutschland
Herasafe Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Inkubator Heraeus BBD 6220	
Biofuge fresco	
Megafuge 1.0 R	
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 135 TV	
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Neustadt, Deutschland
Mikrozentrifuge (PerfectSpin Mini)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Wippschüttler (Heidolph Duomax 1030)	Geneo BioTechProducts GmbH, Lübeck, Deutschland
Thermocycler	BioRad, München, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Ultraschall-Desintegrator Sonifer W-450	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Vectra 3.0 Automated Quantitative Pathology Imaging System	Akoya Biosciences, Massachusetts, USA
Vortexer (IKA® MS 3 digital)	IKA, Staufen im Breigau, Deutschland
Zellzähler (TC10™ Automates Cell Counter)	BioRad, München, Deutschland
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Geräte

## 2.1.6 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform $\geq 99,0\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-erythro-Sphingosin C-18	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	VWR, Darmstadt
DMSO $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Entellan <sup>®</sup> Neu	
Essigsäure $\geq 99,8\%$	
Ethanol $\geq 99,9\%$	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	
Forene 100% (V/V) Isofluran Flüssigkeit zur Herstellung eines Dampfes zur Inhalation PZN -10182054	AbbVie, Wiesbaden
Glycerin $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Ponceau S
Heparin-Natrium 25000 I. E./5 mL PZN -03029843	Ratiopharm, Ulm
Isopropanol $\geq 99,9\%$	Fisher Scientific UK, Leicestershire
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> ) x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller	
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	
Methanol	Fisher Scientific UK, Leicestershire	
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	
Natriumdodecylsulfat (SDS)		
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Natriumchlorid (NaCl)		
Natriumfluorid (NaF)		
Natriumhydroxid (NaOH)		
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )		
Natriumpyrophosphat		
Paraformaldehyd		
Narcoren 16 g/ 100 mL Pentobarbital-Natrium Injektionslösung PZN -11336163		Merial GmbH, Lyon, Frankreich
Perjodsäure		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt	
Salzsäure (HCl)	Fisher Scientific UK, Leicestershire	
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Trizma <sup>®</sup> base [Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan]		
Tris-HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt	
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Tween <sup>®</sup> 20	AppliChem GmbH, Darmstadt	
Wasserstoffperoxid 30 wt % in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Xylol	Thermo Fisher Scientific, Schwerte	

Tabelle 6: Chemikalien

## 2.1.7 Proteine und Reagenzien

Enzym/Reagenz/Größenstandard	Hersteller
Absolute™ Blue QPCR LowROX Mix	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dako Antibody Diluent with Background-Reducing Components S3022	Agilent, Ratingen
Dako Goat Serum	
Dako Real Target Retrieval Solution 10x Citrate pH 6 Concentrate 2031	
Immobilion™ Western Blot Chemiluminescent HRP Substrate	Merck, Schwalbach
Mayer's Hematoxin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Molekulargewichtsstandard (Protein)	Biomol, Hamburg
Pferdeserum	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Schiff'sches Reagenz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIReagent® RNA Isolation Reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, CA, USA
100 bp DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
6x DNA loading dye	
dNTP Mix (10 mM)	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	
Random Hexamer Primer	
RevertAid™ Reverse Transcriptase	
Reaction Buffer, 5x	
PCR Reaction Buffer 10x	
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor	
Roti®-Histofix (4% phosphatgepufferte Formaldehydlösung)	
Rotiphorese®-Gel 30 (37,5:1)	
Roti®-Quant	

Tabelle 7: Proteine und Reagenzien

### 2.1.8 Antikörper für Western Blot

Antikörper	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>	
Anti- $\alpha$ -SMA Klon 1A4 (Maus, monoklonal, 1:5000, A2527)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti- $\beta$ -Aktin (Ziege, polyklonal, 1:3000, sc-1616)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-CTGF (Ziege, polyklonal, 1:1000, sc-14939)	
Anti-GAPDH (Ziege, polyklonal, 1:1000, sc-20357)	
Anti-GAPDH (Maus, monoklonal, 1:3000, GTX627408)	GeneTex (CA, USA)
Anti-Fibronectin-IgG (Kaninchen, polyklonal, ab2413)	abcam, Cambridge, UK
Anti-F4/80 Klon Cl:A3-1 (Maus, monoklonal, 1:200, MCA497R)	Bio-Rad, München
Anti-CerS2 (Kaninchen, polyklonal, 1:1000) HPA027262	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lipocalin-2 (Ziege, polyklonal, AF1857)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
HAVCR/KIM-1 (Ziege, polyklonal, AF1817)	
<b>Sekundärantikörper</b>	
Anti-Maus-Immunglobulin G (IgG) (Schaf, HRP-gekoppelt, 1:5000, #NA934)	GE Healthcare, München
Anti-Ziege-IgG (Esel, HRP-gekoppelt, 1:5000, AP180P)	EMD Millipore (CA, USA)
Anti-Kaninchen-IgG (Esel, HRP-gekoppelt, 1:5000, #NA934)	GE Healthcare, München
Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase (Kaninchen, 1:5)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-Histofine Simple Stain Mouse Max PO Rat 414311F	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan

Tabelle 8: Antikörper für Western Blot

### 2.1.9 Kits

Kit	Hersteller
Alkaline Phosphatase Permanent AP Red Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin
DAB Peroxidase Substrat Kit SK-4100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Mouse on mouse (M.O.M.TM) Elite Peroxidase Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
StressXpress® Creatinine Serum Detection Kit	StressMarq Biosciences Inc., Victoria, BC Canada

Tabelle 9: Kits

### 2.1.10 Angesetzte Lösungen

Wässrige Lösungen			
<b>Ponceau S-Lösung</b>		<b>Trichloressigsäurelösung</b>	
Ponceau S	0,2%	Trichloressigsäure	70%
Trichloressigsäure	3%		
<b>Tris-gepufferte Saline (TBS)</b>		<b>Sammelgelpuffer</b>	
Tris	0,61%	Tris - HCl	0,5 M
NaCl	0,87%	pH 6,8	
pH 7,6			
<b>Lysereagenz (5x)</b>		<b>MOPS-Lösung (5x)</b>	
NaOH	125 mM	MOPS	250 mM
EDTA.Na <sub>2</sub>	1 mM		
pH 12			

Tabelle 10: Angesetzte Lösungen

## 2.1.11 Puffer

Verwendete Puffersysteme in VE-H <sub>2</sub> O	
<b>Trenngelpuffer</b> Tris - HCl 1,5 M pH 8,8	<b>Sammelgelpuffer</b> Tris - HCl 0,5 M pH 6,8
<b>Lysepuffer</b> Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM Glycerol 10% EDTA 2 mM EGTA 2 mM NaF 50 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 10 mM DTT 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 200 µM Triton X-100 1% β-Glycerolphosphat 40 mM pH 7,4 Vor Verwendung wurden 1x PIC und 1 mM PMSF zugegeben.	<b>4x Laemmli-Puffer</b> Glycerol 40% SDS 10% Tris-HCl 125 mM Dithiothreitol (DTT) 50 mM Bromphenolblau 0,01% pH 6,5
<b>10x SDS-Puffer</b> Tris-Base 0,25 M Glycin 2 M SDS 1% pH 8,3	<b>Transferpuffer</b> Tris-Base 25 mM Glycin 200 mM Isopropanol 10% pH 8,3
<b>Phosphatgepufferte Saline (PBS)</b> NaCl 137 mM KCl 2,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM	<b>PBS mit Tween (PBST)</b> NaCl 137 mM KCl 2,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM Tween - 20 (V/V) 0,1%
<b>Sekundärantikörperverdünnung und Blockierungspuffer</b> PBST mit 5% Magermilchpulver	<b>Primärantikörperverdünnung</b> Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM Triton-X 100 2% BSA 3% Pferdeserum 10%
<b>50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)</b> EDTA.Na <sub>2</sub> 50 mM Tris 2 mM Essigsäure 1 M	

Tabelle 11: Puffer



### 2.1.12 TaqMan®-Sonden

Sonde	Ziel mRNA
<b>Gene Mensch</b>	
Hs00426853_g1	<i>smooth muscle actin alpha 2</i>
Hs00164004_m1	<i>Collagen type I alpha 1</i>
Hs00943809_m1	<i>Collagen type III alpha 1</i>
<b>Gene Maus</b>	
Mm00725412_s1	<i>smooth muscle actin alpha 2</i>
Mm00801666_g1	<i>Collagen type I alpha 1</i>
Mm01254476_m1	<i>Collagen type III alpha 1</i>
Mm01258345_g1	<i>Ceramide synthase 2</i>
Mm00510998_m1	<i>Ceramide synthase 5</i>
Mm00556165_m1	<i>Ceramide synthase 6</i>
Mm01252547_g1	SK-1
Mm00445021_g1	SK-2
Mm00514644_m1	S1P <sub>1</sub>
Mm02620208_s1	S1P <sub>2</sub>
Mm02620181_s1	S1P <sub>3</sub>
Mm02620565_s1	S1P <sub>5</sub>
Mm00461932_g1	Spns2
Mm01192933_g1	CTGF
Mm01256744_m1	Fn-1
Mm00506686_m1	Kim-1
Mm01324470_m1	Lcn2
Mm00435858_m1	Pai-1
Mm00446190_m1	IL-6
Mm00441242_m1	Ccl2
Mm00840904_m1	Nlrp3
Mm00443258_m1	Tnf- $\alpha$
Mm00434228_m1	IL-1 $\beta$
Mm00802529_m1	Adgre1

Tabelle 12: TaqMan®-Sonden

### 2.1.1 Primer für die Genotypisierungen

Primer	Sequenz (5' – 3')
Spns2 (vorwärts)	CAAAACAATATGGGCTGGGG
Spns2 (revers)	GATGAAGGCAGGACTCAGGG
Spns2 (Kassette)	TCGTGGTATCGTTATGCGCC
S1P <sub>5</sub> (vorwärts)	TCCTCGGTTCTAAACCTTCTC
S1P <sub>5</sub> (revers)	CTCTAAAGCAATGGCCAAGAG
DsRed (revers)	TTGGTCACCTTCAGCTTCACG

Tabelle 13: Primer für die Genotypisierungen

Die verwendeten Primer für die Genotypisierungen und die TaqMan<sup>®</sup>-Sonden wurden bei Thermo Fisher Scientific (Schwerte) erstanden.

### 2.1.1 Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism - V. 5.02	Graphpad Software, San Diego, USA
ImageJ - V. 1.51j8	National Institutes of Health, Bethesda, USA
inForm <sup>®</sup> Tissue Finder <sup>™</sup>	Akoya Biosciences, Massachusetts, USA
Phenochart <sup>®</sup>	
Vectra <sup>®</sup>	
TaqMan <sup>®</sup> - 7500 Fast - V. 1.4.0	AppliChem GmbH, Darmstadt
ZEISS ZEN Imaging Software - V. 2008	Carl Zeiss, Jena
ChemSketch V. 2020.1.2	ACD/Labs

Tabelle 14: Software

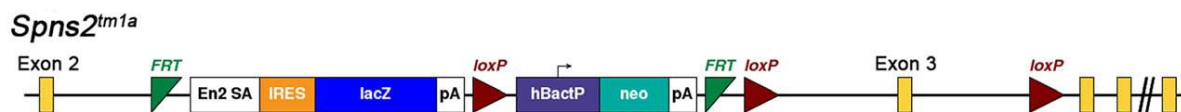
## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München, Deutschland
CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen 15 mL und 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Corning® 500 mL Filter System	Corning, New York, USA
Eppendorf Reaktionsgefäß (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen CELLSTAR® (2 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
MicroAmp® Fast Optical 96-Well reaction plate	Life Technologies, Darmstadt
Kryoröhrchen Cellstar (2 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulosemembran, 0,45 µm	BioRad, München, Deutschland
Pasteur Capillary Pipettes, 230 mm	WU Mainz, Bamberg, Deutschland
PCR Soft Tubes, 0,2 mL	Biozym Biotech, Wien, Österreich
Steriflip® (Sterilfiltersystem)	Merck Millipore, Darmstadt
Stripette® (Zellkulturpipetten)	Corning Incorporated, New York, USA
Whatman® Filterpapier (3 MM)	Whatman International Ltd., Maidstone, GB
Zählkammer TC10™ System Counting Slides, Counting Slides Dual Chamber for Cell Counter	BioRad, München, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6- und 24-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, 25 cm	Sarstedt, Newton, USA

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien

### 2.1.3 Verwendete Tiere

Spns2<sup>+/-</sup>-Mäuse (*Mus musculus* Spns2<sup>tm1a</sup>(KOMP)Wtsi) wurden wie bereits beschrieben generiert (Chen *et al.* 2014) und von Prof. Paul van Veldhoven (Katholieke Universiteit Leuven, Belgien) erhalten. Es wurde eine L1L2\_Bact\_P-Kassette an Position 72464268 des Chromosoms 11 per Kassettenaustauschverfahren eingefügt (Abbildung 9). Für die Isolation der Primärzellen wurden Spns2<sup>-/-</sup>-Mäuse und korrespondierende Wildtypen (Spns2<sup>+/+</sup>-Mäuse) verwendet.



**Abbildung 9: Schema der Herstellung des Spns2<sup>-/-</sup> mittels des Kassettenaustauschverfahrens.** Abgebildet sind eine promotorgesteuerte Genkassette, welche eine Spleiß-Akzeptorseite, eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und einen β-Galaktosidase Reporter (lacZ) enthält. Anschließend folgt ein Neomycinresistenzmarker (neo), welcher unter der Kontrolle eines unabhängigen β-Aktin-Promotors steht. Diese Kassette wurde in das Intron 2 von Spns2 eingeschleust. FRT (*flippase recognition target*)-Sequenzen flankieren die Kassette und LoxP (*locus of X-over P1*)-Sequenzen flankieren das Exon 3 (Chen *et al.* 2014).

Die S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse wurden im The Scripps Research Institute (La Jolla, CA, USA) generiert und uns von Prof. Dr. Jerold Chun zur Verfügung gestellt (Jenne *et al.* 2009). Die gesamten kodierenden Gensequenzen von S1P<sub>5</sub> wurden, bis auf die Sequenz, welche für die ersten sieben Aminosäuren kodiert, mit herkömmlichen molekularbiologischen Methoden deletiert. Hierfür wurde der Vektor pBluescript (Agilent Technologies) verwendet. Es wurde zudem die Sequenz für DsRed von DsRed-N1 (Takara Bio Inc.) eingefügt. Die Orientierung der Neomycinkassette unter Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors liegt umgekehrt zu der des S1P<sub>5</sub>-Lokus.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Isolation von Glomerula zur Kultivierung von Mesangiumzellen der Maus**

Nach der schmerzfreien Tötung der Maus wurde der Bauchraum geöffnet und eine der beiden Niere mit einer Pinzette fixiert. Anschließend wurde mit einer Schere das Fettgewebe und die Nierenarterie abgetrennt. Mit Hilfe von Pinzetten wurde die Nierenkapsel abgezogen und die Niere in ein 15 mL Reaktionsgefäß, gefüllt mit sterilem PBS, gelegt. Der Vorgang wurde mit der verbliebenen Niere wiederholt. Die Glomeruli wurden mit Hilfe eines Siebsystems isoliert. Die Maschenweite der Siebe betrug 180 µm oben, 106 µm in der Mitte und 53 µm unten. Die Nieren wurden auf das oberste Sieb gelegt, mit einem Skalpell zunächst zerhackt und schließlich mit Daumen oder Fingern in sterilen Handschuhen durch das Sieb gerieben. Es wurde mit sterilem PBS nachgespült, sodass sich möglichst viel Gewebe auf dem mittleren Sieb ansammeln konnte. Hier wurde auch wieder Gewebe durch das Sieb gedrückt und mit PBS nachgespült. Die glomerulären Kapseln und tubuläre Bruchstücke blieben auf dem oberen und mittleren Sieb hängen. Auf dem unteren Sieb sammelten sich somit die Glomerula, welche aufgrund ihrer Größe nicht mehr passieren konnten. Einzelne, aus dem Blut stammende Zellen und das PBS wurden in das Auffangbecken gespült. Das unterste Sieb wurde aus dem Siebssystem herausgenommen, um 180° gedreht und über eine Zellkulturschale mit 150 mm Durchmesser gelegt. So konnten die Glomerula nun mit PBS von dem Sieb in die Zellkulturschale gespült werden. Die Glomerula wurde mit Hilfe eines Zellkulturschabers und Pipette in 50 mL Reaktionsgefäßen überführt und bei 1000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Das PBS wurde abgesaugt und die Glomerula in 3 mL Wachstumsmedium resuspendiert und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Die Glomerula wurden zunächst für 3 Wochen im Brutschrank inkubiert, da die Mesangiumzellen diese Zeit benötigen, um die anderen Zellen des Glomerulums zu überwachsen.

### **2.2.2 Kultivierung der Zellen**

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit unter Verwendung des jeweiligen Wachstumsmediums. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **2.2.3 Stimulation adhärent wachsender Zellen**

Um die Zellen für ein Experiment verwenden zu können, wurden sie von den Kulturflaschen in Zellkulturschalen oder Zellkulturplatten überführt. Hierfür wurde zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin/EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und die Zellkulturflasche zurück in den Brutschrank gestellt. Nach ein paar Minuten hatten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst oder wurden gegebenenfalls noch durch leichte Schläge gegen die Wand der Flasche abgelöst. Die Zellen wurden im stets vorgewärmten Wachstumsmedium resuspendiert, in sterile Cellstar™ Röhren überführt, pelletiert und die Flüssigkeit abgesaugt. Zum Aussäen wurden die Zellen in frischem Wachstumsmedium verdünnt. Für Experimente wurden die Zellen in Zellkulturschalen oder Zellkulturplatten ausgelegt und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Anschließend wurde das Wachstumsmedium der Zellen für 24 h gegen Hungermedium getauscht, um die Zellen in die Ruhephase zu versetzen. Für die Stimulation der Zellen wurden die verwendeten Substanzen in Stimulationsmedium in Cellstar™ Röhren angesetzt.

### **2.2.4 Zellzählung**

Adhärenente Zellen wurden wie im vorigen Abschnitt beschrieben in Suspension gebracht. 20 µL der Zellsuspension wurden 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung behutsam vermischt und etwa 20 µL des Gemischs auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops untersucht. Das Trypanblau konnte nur die toten Zellen blau anfärben, wohingegen lebende Zellen mit intakter Zellmembran farblos blieben. Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in der Zellsuspension wurden diese in den eingeschliffenen Quadranten mit definiertem Volumen gezählt.

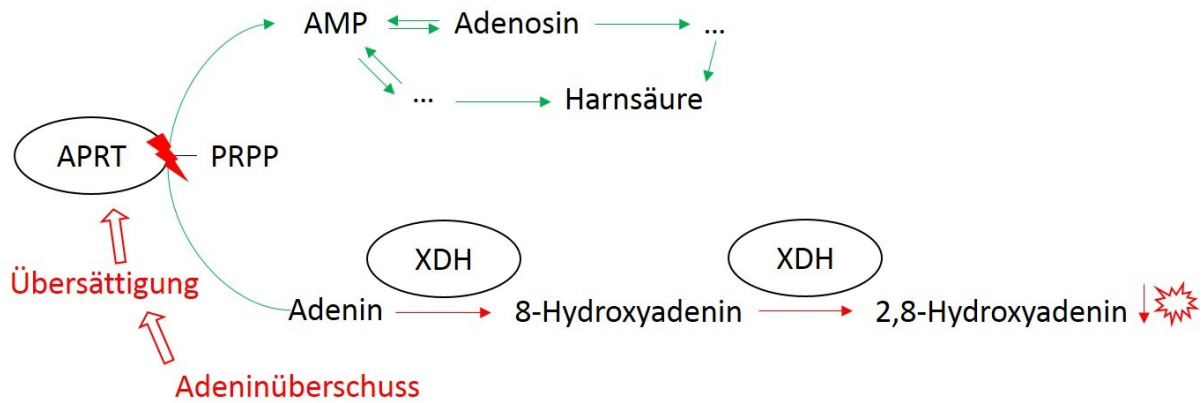
### **2.2.5 Kryokonservierung**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, trypsiniert, in Wachstumsmedium aufgenommen und für 5 Minuten bei 800 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Einfriermedium, bestehend aus 45% Wachstumsmedium, 45% FKS und 10% DMSO resuspendiert und in sterile Kryoröhrchen überführt. Diese wurden anschließend in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Mr. Frosty™) langsam auf -80°C abgekühlt und zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen unverzüglich in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt und die Zellsuspension mit Wachstumsmedium in ein Cellstar™ Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und zur Kultivierung in Zellkulturflaschen überführt.

## **2.3 Modell der Adenin-induzierten tubulointerstitiellen Nierenfibrose der Maus**

Durch eine Übersättigung der Adeninphosphoribosyltransferase (APRT) wird Adenin über die Xanthindehydrogenase (XDH) zu 2,8-Dihydroxyadenin (2,8-DHA) anstatt zu Adenosinmonophosphat (AMP) verstoffwechselt (Abbildung 10) (Zaidan *et al.* 2014). 2,8-DHA ist wasserunlöslich und präzipitiert unter der Bildung von Kristallen im Gewebe, wenn es nicht über den Urin vorher ausgeschieden werden kann. Hierdurch wird das Gewebe geschädigt und eine Entzündungsreaktion hervorgerufen. Sowohl im Menschen wie auch in Mäusen lagern sich die Kristalle vor allem im Lumen der Tubuli und im Zytosol von Tubulusepithelzellen an und führen zu einer tubulointerstitiellen Fibrose (Zaidan *et al.* 2014; Jia *et al.* 2013).



**Abbildung 10: Stoffwechselweg für den Abbau von Adenin und die Folgen einer Übersättigung für die Niere (Zaidan et al. 2014).**

Durch eine Übersättigung des Enzyms Adeninphosphoribosyltransferase (APRT) mit Adenin, kann dieses nicht mehr vollständig unter Verbrauch von 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) über Adenosinmonophosphat (AMP) bis zur Ausscheidung als Harnsäure verstoffwechselt werden. Stattdessen wird das überschüssige Adenin mit Hilfe der Xanthindehydrogenase (XDH) zu 2,8-Dihydroxyadenin umgewandelt, welches im Gewebe auskristallisiert und zur Nephropathie führt.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in der zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) der Universitätsklinik Frankfurt am Main. Alle Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden in einem Halterungsraum mit einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus und einer konstanten Raumtemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  gehalten. Die Durchführung des Tiermodells der Adenin-induzierten tubulointerstitiellen Nierenfibrose, fortan AN-Modell genannt, erfolgte unter Berücksichtigung der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und nach einem zuvor vom zuständigen Regierungspräsidium bewilligten Tierversuchsantrag. Für den Versuch wurden männliche  $\text{S1P}_5^{-/-}$ -Mäuse bzw. deren korrespondierende Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J-Mäuse) verwendet. Das Standardfutter wurde durch eine adeninhaltige Diät ersetzt und den Versuchstieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Am Ende der jeweiligen Versuchsdauer wurden die Tiere schmerzfrei getötet und anschließend die Nieren, Leber, Milz und Blut für weitere Untersuchungen entnommen.

Die Organe wurden kurz in Zellkulturschalen mit PBS gewaschen. Bei einer Niere wurde die Nierenkapsel entfernt und das Organ der Länge nach halbiert. Die Milz und der Leberlappen wurden ebenfalls halbiert. Die beiden Hälften der einen Niere und eine Hälfte der Milz und des Leberlappens wurden jeweils in eine Einbettkassette



gefasst und in eisgekühltes Formalin gelegt, um sie später für histologische Untersuchungen verwenden zu können. Die andere Niere und die verbliebenen Hälften der Milz und des Leberlappens wurden trocken getupft, in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die tiefgefrorenen Organe bzw. Teile davon wurden in flüssigen Stickstoff überführt und mit Hilfe eines Dismembrators (B. Braun, Melsungen) pulverisiert. Hierfür wurden die Zylinder und Kugeln des Dismembrators ebenfalls in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das Organ wurde zusammen mit der Kugel in einen Zylinder gesteckt und dieser in das Gerät eingespannt. Bei 3000 Upm für eine Dauer 20 Sekunden wurden die Organteile zu einem Pulver verarbeitet. Die Homogenisate wurden mit vorgekühlten Spateln auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt. Für die Lipidanalytik musste das Gewicht der Homogenisate gemessen werden. Hierfür wurde zuvor das Leergewicht der 1,5 mL Reaktionsgefäße ermittelt und anschließend nach Augenmaß eine Menge von ca. 15 mg überführt, unmittelbar das Gewicht bestimmt und die Proben in flüssigen Stickstoff geworfen, bevor sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Um die RNA isolieren zu können, wurde 1 mL TRI<sup>®</sup> Reagenz zu einer Menge von 20 bis 30 mg Homogenisat gegeben und die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Proteinanalytik wurde eine Menge von ca. 40 mg Homogenisat mit 500  $\mu\text{L}$  Lysispuffer auf Eis vermischt und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.4 Lipid-Analyse mittels LC-ESI-MS/MS**

Die Organe, Plasma und Zellkulturproben wurden zur Bestimmung und Quantifizierung der Sphingolipide mit Hilfe von Flüssigchromatographie mit Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie-Kopplung und anschließender Tandem Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) durch das Institut für Klinische Pharmakologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geißlinger aufgearbeitet, gemessen und ausgewertet. Die Gewebeprobe wurden mit einem Gemisch aus Ethanol in Wasser (1:3 V/V) versetzt und mittels einer Scheibenschwing-Mühle (Retsch, Haan) mit vier Zirconiumoxid-Kugeln für 2,5 Minuten bei 25 Hz aufgearbeitet und auf eine Konzentration von 0,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gebracht. 50  $\mu\text{L}$  der Gewebesuspension wurden mit 20

$\mu\text{L}$  eines internen Standards und mit 150  $\mu\text{L}$  eines Extraktionspuffers (30 mM Citronensäure und 40 mM Dinatriumhydrogenphosphat) vermischt.

Die Mischung wurde mit 600  $\mu\text{L}$  Methanol/Chloroform/Salzsäure (15:83:2, V/V/V) extrahiert. Die untere, organische Phase wurde bei 45°C und unter einem sanften Stickstofffluss verdampft und in 50  $\mu\text{L}$  Tetrahydrofuran/Wasser (9:1 V/V) mit 0,2% Ameisensäure und 10 mM Ammoniumformiat wieder gelöst. Von den Standards zur Kalibrierung und von den Proben für die Qualitätskontrolle wurden im Gegensatz zu den 50  $\mu\text{L}$  von den zu untersuchenden Homogenisaten nur stets 20  $\mu\text{L}$  verwendet. Zu Beginn und am Ende jedes Laufes wurden drei verschiedene Konzentrationen der Qualitätskontrollproben (niedrig, mittel, hoch) gemessen.

Für die chromatographische Auftrennung der Sphingolipide wurde ein Agilent 1290 HPLC System bestückt mit einer Zorbax C18 Eclipse Plus UHPLC Säule (2,1 \* 50 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Die Tandem-Massenspektrometrie-Analyse wurde mit einem hybriden Tripel-Quadrupol-Ionenfallen Massenspektrometer QTRAP 5500 (Sciex, Darmstadt) durchgeführt, welches mit einer Turbo V Ionenquelle, die im positiven Elektrospray-Ionisierungsmodus betrieben wurde, ausgestattet war. Die Daten wurden mit Analyst Software Version 1.6 und MultiQuant Software Version 3.0 (beides von Sciex, Toronto Kanada) 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.

### **2.4.1 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) verwendet. Schwanzbiopsien oder Ohrstanzen der Mäuse wurden hierfür in 0,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 1 Stunde bei 95°C in 50  $\mu\text{L}$  eines basischen Lysereagens gekocht, um die Zellen aufzuschließen und die DNA zugänglich zu machen. Anschließend wurde das Gewebeextrakt mit 50  $\mu\text{L}$  einer MOPS-Lösung (50 mM) neutralisiert und die Proben kurz abzentrifugiert, um grobe Gewebestücke zu pelletieren.

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet (Volumen pro Probe):

5 µL	10x PCR Reaction Buffer
3 µL	25 mM MgCl <sub>2</sub>
2 µL	10 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2 µL	10 µM Primer ( <i>forward</i> )
2 µL	10 µM Primer ( <i>reverse</i> )
0,3 µL	Taq Polymerase (5 U/µL)
5 µL	Gewebeextrakt
30,7 µL	ddH <sub>2</sub> O

Temperaturprogramm des Thermocyclers:

94°C	3 Minuten	
94°C	30 Sekunden	
55°C*	30 Sekunden	*abhängig von der Schmelztemperatur der Primer
72°C	30 Sekunden	} 40 Zyklen
72°C	7 Minuten	

Die Proben wurden anschließend mittels Gelelektrophorese und UV-Licht analysiert.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Proben wurden mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht. Für die Analyse der PCR-Produkte aus den Genotypisierungsreaktionen wurden Gele aus 15 g/L Agarose in TAE-Puffer verwendet, die mit GelRed<sup>®</sup> nach Anleitung des Herstellers gefärbt wurden, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die Proben und die 100 bp DNA-Leiter wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (Thermo Scientific) angesetzt, auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese wurde für 100 Minuten bei 90 V in einer Elektrophoresekammer, betrieben durch den Power Pac 200 (BioRad), durchgeführt. Abschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (300 nm) sichtbar gemacht.

### 2.5.2 RNA-Isolierung

Um die Zersetzung der RNA durch omnipräsente RNasen zu vermeiden, wurde für die RNA-Isolierung stets DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet. Hierfür wurde eine 0,1%ige-Lösung von DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt, welche bei 37°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag autoklaviert wurde. Durch diesen Prozess werden vorhandene RNasen inaktiviert und DEPC zerfällt zu Ethanol und Kohlendioxid.

Die Isolierung der mRNA aus den Zellen wurde mit Hilfe von TRI<sup>®</sup>Reagenz nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Stimulationsmedium der Zellen wurde abgesaugt oder gegebenenfalls in 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und je 1 mL TRI<sup>®</sup>Reagenz auf den Zellrasen in der Zellkulturplatte gegeben. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform und 20-fachem Invertieren der Reaktionsgefäße wurde über eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C eine Phasentrennung des Gemisches erzielt. Die RNA-haltige obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein frisches 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µL Isopropanol versetzt. Die Gefäße wurden erneut 20 Mal invertiert und anschließend für 5 Minuten bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Isopropanol verworfen, die präzipitierte RNA mit 75%iger Ethanol-Lösung (V/V) gewaschen und nach dem Verwerfen des Ethanols für 10 bis 30 Minuten bis zur Verdunstung jeglicher Flüssigkeit bei 55°C im Thermomixer getrocknet. Das Pellet wurde entsprechend seiner Masse mit 20-50 µL DEPC-H<sub>2</sub>O unter zur Hilfenahme des Thermomixers gelöst (10 Minuten, 1000 Upm, 55°C). Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

### 2.5.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung isolierter RNA

Die Konzentration isolierter RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop™ ND-1000 Spektrophotometers bestimmt. Die Konzentration errechnete sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung sowie dem für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor 40.

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

c = Konzentration der Probe

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (40 für RNA)

Durch das Verhältnis aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> kann eine Aussage über die Phenol- und Proteinverunreinigung der RNA getroffen werden. Bei geringer Kontamination liegt der Quotient bei ca. 2,0.

### 2.5.4 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wurde die messenger-RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Primer diente eine Mischung aus zufälligen Hexanukleotiden (Random Hexamer Primer) mit 5'- und 3'- Hydroxylgruppenende.

Folgender Ansatz wurde je Probe verwendet und in 0,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert:

1,2 µg	RNA
1 µL	Random Hexamer Primer
ad 12,5 µL	DEPC-H <sub>2</sub> O

Die Anlagerung der Random Hexamer Primer an die mRNA (Primerhybridisierung) wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 70°C ermöglicht. Anschließend wurden die Proben wieder auf Raumtemperatur gebracht und folgender Mastermix hinzugefügt (Volumen pro Probe):

4 µL	5x Reaction Buffer
0,5 µL	RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/µL)
2 µL	10 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1 µL	RevertAid™ Reverse Transcriptase (200 U/µL)

Danach wurden die Proben für 60 Minuten bei 42°C im Thermocycler inkubiert für die Synthese des cDNA-Strangs. Zum Schluss wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert, indem die Temperatur für 10 Minuten auf 70°C erhöht wurde. Die Proben wurden im Verhältnis von 1:5 mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.5.5 Quantitative Real-Time-PCR (Taqman®)

Die quantitative Real-Time-PCR (RT-qPCR) wurde für die Quantifizierung der mRNA ausgewählter Gene in den Proben eingesetzt. Das Verfahren basiert auf dem klassischen PCR-Verfahren zur Vermehrung der cDNA, bei der zusätzlich die Menge der amplifizierten DNA-Stränge je Zyklus über Fluoreszenz in Echtzeit gemessen wird. Um die gemessene Genexpression in den Proben in Relation setzen zu können, wurde in jeder Probe die Menge der transkriptionell kaum regulierten 18S rRNA bestimmt (sogenanntes Haushaltsgen). Für die RT-qPCR wurden cDNA-haltige Proben verwendet, die wie im Abschnitt 2.5.4 hergestellt wurden. Folgende Reagenzien wurden in 0,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert:

Haushaltsgen (18S)	Zielgen	Reagenz
1 µL	5 µL	cDNA
0,3 µL	1 µL	Sonde inklusive Primer
9 µL	9 µL	LowRox Mix
9,7 µL	5 µL	ddH <sub>2</sub> O

Die verwendeten Sonden sind in Abschnitt 2.1.12 (Tabelle 14) aufgeführt. Der beschriebene Reaktionsansatz wurde für die Möglichkeit einer Doppelbestimmung auf jeweils zwei *wells* einer 96-*well*-Platte verteilt und nach Versiegelung der Platte mittels einer durchsichtigen Folie in dem „7500 Fast Real-Time PCR System“ unter Verwendung von folgendem Temperaturprogramm analysiert:

50°C	5 Sekunden	
94°C	15 Minuten	
60°C	60 Sekunden	
94°C	15 Sekunden	} 40 Zyklen
94°C	15 Sekunden	
60°C	60 Sekunden	

Für die Auswertung mittels der 7500 Fast System SDS Software Version 1.4 wurde *Cycle threshold*-Wert ( $C_t$ -Wert) herangezogen. Er bildet den Schnittpunkt zwischen der Amplifikationskurve und dem Schwellenwert. Der Schwellenwert wurde hierbei so gesetzt, dass der  $C_t$ -Wert an einer Position auf der Amplifikationskurve ausgelesen wird, an der das Fluoreszenzsignal exponentiell pro Zyklus ansteigt und sich deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte anschließend nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 Präparation von Zelllysaten und Gewebekomogenisaten

Für die Untersuchung der Proteinexpression wurden die Zellen zunächst, wie in den Abschnitten 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben, kultiviert, stimuliert und am Ende mit DPBS gewaschen. Die nachfolgenden Schritte wurden stets auf Eis durchgeführt. Auf den Zellrasen wurde, je nach Größe der verwendeten Zellkulturschalen, 100-200  $\mu$ L Lysepuffer gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen der Zellsuspensionen bzw. der Gewebekomogenisate mit Hilfe eines Ultraschallstabs (Branson Sonifer W-450) aufgeschlossen und das Gemisch zentrifugiert (10 Minuten, 13.000 Upm, 4°C). Der

Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes**

Die Bestimmung des Proteingehalts der Zellysate oder Gewebehomogenisate erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Es wurde für jede Messung eine neue BSA-Standardreihe in VE-H<sub>2</sub>O mit einem Konzentrationsbereich zwischen 0 (*blank*) und 30 µg/mL und 800 µL Gesamtvolumen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen angesetzt. Für die zu untersuchenden Proben wurden je 795 µL VE-H<sub>2</sub>O in 1,5 mL Reaktionsgefäßen vorgelegt und 5 µL der Probe hinzugegeben. Alle Proben der Standardreihe und die Probenverdünnungen wurden mit 200 µL Bradford Protein Assay-Reagenz (Roti®-Quant) auf 1 mL aufgefüllt und gut vermischt. Nach 10 Minuten Inkubation im Dunkeln wurden jeweils 100 µL in einer Doppelbestimmung luftblasenfrei in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 595 nm mit Hilfe des Mikroplatten-Lesegeräts Sunrise (Tecan, Neustadt) gemessen. Die Umrechnung auf die Proteinmenge in den Proben wurde mit Hilfe von Magellan3 (Tecan, Neustadt) und Excel durchgeführt.

### **2.6.3 Trichloressigsäure-Proteinfällung aus Zellkulturüberständen**

Der zu untersuchende Zellkulturüberstand wurde nach dem Experiment in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend schonend zentrifugiert, um Zellen zu pelletieren (2000 rpm, 4°C, 5 Minuten). 90% (V/V) des Überstands wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden ggf. bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Um den Überstand von Zellresten zu befreien, wurden die Proben bei 13000 Upm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und wiederum 90% (V/V) des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der Proteine wurde eine Trichloressigsäure-Lösung (70%) im Verhältnis 1:10 hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Proben wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für weitere 30 Minuten bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Jegliche Flüssigkeit wurde sorgfältig und restlos entfernt. Zu den Proben wurde je nach Größe



des Pellets 30-75  $\mu\text{L}$  Tris/HCl (pH 8,5) hinzugegeben und das Pellet mittels einer Inkubation im Thermomixer bei  $50^\circ\text{C}$  und 1400 Upm für eine Dauer von 20 Minuten gelöst. Die Proben wurden kurz mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und 4x Laemmli-Puffer im Verhältnis 1:4 hinzugegeben und vermischt. Die Proben wurden bei  $95^\circ\text{C}$  für 10 Minuten zur Denaturierung der Proteine erhitzt, kurz abzentrifugiert und bis zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels Western Blot wurde zunächst die *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) nach Laemmli zur Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe durchgeführt (Laemmli 1970). Hierfür wurden jeweils entsprechende Volumina der Lysatproben für 30  $\mu\text{g}$  Protein entnommen und mit Lysispuffer auf ein Volumen von 30  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Diese Verdünnungen wurden mit je 10  $\mu\text{L}$  4x Laemmli-Puffer vermischt und die Proteine für 10 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert. Die fertigen Proben aus den Zelllysaten, Gewebehomogenisaten oder Zellkulturüberständen sowie 6  $\mu\text{L}$  eines Molekulargewichtsstandards wurden in die Geltaschen eines diskontinuierlichen Systems aus einem oben liegenden Sammelgel, welches die Taschen für die Proben bildet, und einem Trenngel zur Separation der Proteine gefüllt. Die Gelelektrophorese wurde für die Aufenthaltszeit der Proben im Sammelgel bei 70 V und für die Auftrennung im unten liegenden Trenngel bei 100 V in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Zusammensetzung des Trenngels (Tabelle 16) richtete sich nach der Größe des Zielproteins, um eine optimale Auflösung zu erreichen.

### 2.6.4.1 Herstellung der Gele

Für die SDS-PAGE wurden die Polyacrylamidgele mit Hilfe von speziellen Gelapparaturen gegossen. Ca. 10 mL einer Trenngellösung wurde zwischen die Glasplatten der Apparatur gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Schicht, die frei von Luftblasen ist, zu erhalten. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgeschüttet, das Trenngel mit ca. 2,5 mL Sammelgellösung überschichtet und sogleich die Taschenkämme eingesetzt. Die

auspolymerisierten Gele wurden aus der Apparatur entfernt und entweder sofort verwendet oder für kurze Zeit in feuchte Tücher gewickelt, in Plastiktüten verstaut und im Kühlschrank gelagert.

<b>Trenngellösungen</b>	<b>6%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>
Rotiphorese®	4,1 mL	6,7 mL	8 mL	10 mL
Trenngelpuffer	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
H <sub>2</sub> O	10 mL	8 mL	6,7 mL	4,6 mL
SDS 10%	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
APS 10%	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Tabelle 16: Zusammensetzung der Trenngellösungen für 2 Gele

<b>Sammelgellösung</b>	
Rotiphorese®	1,3 mL
Sammelgelpuffer	2,5 mL
H <sub>2</sub> O	6 mL
SDS 10%	100 µL
APS 10%	60 µL
TEMED	20 µL

Tabelle 17: Zusammensetzung der Sammelgellösung für 2 Gele

### 2.6.5 Western Blot-Analyse

Die mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden nach dem Western Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, auf der anschließend der immunchemische Nachweis bestimmter Proteine erfolgen konnte.

### **2.6.5.1 Elektrotransfer nach dem Wet-Blot-Verfahren**

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nun senkrecht zur vorangehenden Laufrichtung über ein weiteres elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen („Blotten“). Für den Transfer der Proteine wurde folgendes „Sandwich“ in einer Schale gefüllt mit Transferpuffer zusammengelegt: Elektrodenschwamm, zwei Whatman-Papiere, Nitrozellulosemembran, Polyacrylamid-Gel, zwei Whatman-Papiere, Elektrodenschwamm. Um Luftblasen zwischen Membran und Gel zu entfernen, wurden unter leichtem Druck mit einem Glasstab über das Sandwich gerollt. Das fertige Sandwich wurde in einen Schlitten gespannt und so in die Transferkammer (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell) gestellt, dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode zeigt. Die Transferkammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und auf Eis gestellt. Das „Blotten“ erfolgte für 75 Minuten bei 70 V und wurde zum Schluss durch reversible Anfärbung aller Proteine auf der Membran überprüft. Hierfür wurde die Membran kurz in eine Ponceau-S-Lösung gelegt und nach optischer Kontrolle mittels PBST wieder vom Farbstoff befreit.

### **2.6.5.2 Immunchemischer Nachweis von Proteinen**

Die Zielproteine wurden immunchemisch durch die Bindung von Antikörpern und mittels Chemilumineszenz detektiert. Damit die Antikörper sich nicht wie beim „Blotten“ unspezifisch an die Membran anlagern, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in eine mit Milchpulverlösung (5%) gefüllte Schale auf einen Schüttler gestellt. Anschließend wurde die Milchlösung weggeschüttet, die Schale mit PBST gefüllt und für 10 Minuten auf einen Schüttler gestellt, bevor die Lösung verworfen wurde. Dieser Schritt wurde dreimal durchgeführt und folgend als „PBST-Waschschritt“ zusammengefasst. Die Membran wurde anschließend mit einer entsprechenden Lösung des Erstantikörpers, welcher an das Zielprotein bindet, über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach folgte ein PBST-Waschschritt und die Membran wurde daraufhin mit einer entsprechenden Lösung des Zweitantikörpers, welcher an den Erstantikörper bindet und an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Ein weiterer PBST-Waschschritt erfolgte, die feuchte Membran wurde auf eine Glasplatte gelegt und für eine Minute mit dem Substrat für Chemilumineszenzreaktion der Peroxidase benetzt.

Zur Visualisierung und Dokumentation des Zielproteins wurde die Membran in eine Klarsichtfolie gesteckt, diese in eine Filmkassette gelegt und in eine Dunkelkammer gebracht. Dort wurde ein Autoradiographiefilm für wenige Sekunden bis Minuten auf die Membran gelegt und dieser mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt.

Die entwickelten Filme wurden nach Abpausen des Molekulargewichtsstandards eingescannt und die Banden des Zielproteins mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ 1.51j8 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) quantifiziert. Dazu wurde die optische Dichte und Größe der Proteinbanden des Zielproteins und des Referenzproteins bestimmt. Somit konnte die Expression des Zielgens in Relation zur Expression eines Haushaltsgens semiquantitativ bestimmt werden. Mit der Membran wurde erneut ein PBST-Waschschritt durchgeführt und diese direkt für einen weiteren immunchemischen Nachweis verwendet oder aber zur Lagerung getrocknet.

## **2.7 Histologische Immunchemie**

### **2.7.1 Vorbereitung der Paraffinblöcke**

Die Organe wurden über Nacht bei 4°C in 4% Formalin fixiert. In einer automatischen Gewebeeinfiltrationsmaschine wurden die Organe nacheinander in 50%, 75%, 90%, 96% und 100% Ethanol, Isopropanol und Xylol dehydriert und zuletzt mit Paraffin infiltriert. Die getrockneten Organe wurde in Einbettformen aus Edelstahl gelegt und in flüssigem Paraffin eingebettet. Zur Aushärtung wurden die Blöcke auf eine Kühlplatte gelegt. Zur histologischen Untersuchung wurden 3 µm dünne Schnitte der Organe abgeschnitten, in einem warmen Wasserbecken ausgelegt, auf Objektträger übertragen und bei 37°C auf einer Heizplatte über Nacht getrocknet. Auf den fertigen Schnitten konnten nachfolgend spezifische Proteine oder Organelle mit Antikörpern oder Farblösungen angefärbt werden.

### 2.7.2 PAS-Reaktion

Mit der *periodic acid-Schiff reaction* (PAS-Reaktion) werden Bindegewebe, Membranen und Zellwände durch eine rosa bis magentafarbene Färbung sichtbar gemacht. Für die Deparaffinisierung wurden die Schnitte nacheinander in Schalen mit folgendem Inhalt getaucht:

10 Minuten Xylol, 10 Minuten Xylol, 5 Minuten 100% Ethanol, 5 Minuten 90% Ethanol, 5 Minuten 70% Ethanol, 5 Minuten 50% Ethanol, 5 Minuten VE-Wasser.

Die Schnitte wurden für 5 Minuten in 0,8% Perjodsäure gelegt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde Schiff'sches Reagenz für 20 Minuten auf die Schnitte pipettiert, sodass das Gewebe komplett bedeckt war. Das Reagenz wurde mit Leitungswasser abgespült und die Schnitte anschließend für zehn Sekunden in Hematoxylin getaucht, um die Zellkerne anzufärben. Das Hematoxylin wurde mit Leitungswasser abgewaschen und die Schnitte für 3 Minuten in destilliertes Wasser gegeben. Zuletzt wurden die Schnitte wieder entwässert, indem die oben aufgeführte Reihe zur Deparaffinisierung rückwärts durchlaufen wurde. Direkt im Anschluss wurde zum Eindecken ein Deckglas mit Hilfe von Entellan® auf die Schnitte unter Ausübung von Druck geklebt. Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop (Axiovert 200 Vergrößerung x100, Zeiss) betrachtet und repräsentative Aufnahmen (Leica DFC310 FX Kamera, Leica Camera AG) gespeichert.

### 2.7.3 Makrophagen-Infiltration

Zum Nachweis der Infiltration des Gewebes mit Makrophagen wurde ein Antikörper gegen das EGF-ähnliche modulhaltige Mucin-ähnliche Hormonrezeptor-ähnliche 1 Protein (EMR<sub>1</sub>) auch bekannt als F4/80 verwendet. Für die Deparaffinisierung wurden die Schnitte nacheinander in Schalen mit folgendem Inhalt getaucht:

10 Minuten Xylol, 10 Minuten Xylol, 5 Minuten 100% Ethanol, 5 Minuten 90% Ethanol, 5 Minuten 70% Ethanol, 5 Minuten 50% Ethanol, 5 Minuten VE-Wasser.

Citratpuffer von Dako wurde 1:10 mit Wasser verdünnt, ein Gefäß, in welches die Schnitte gestellt wurden, mit diesem Puffer gefüllt und für 10 Minuten bei 800 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Der Puffer wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und zwei

Mal mit TBS gewaschen. Der Antikörper gegen F4/80 wurde in Dako Antibody Diluent 1:200 verdünnt. 100  $\mu$ L dieser Verdünnung wurden auf einen Schnitt pipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Schnitte wurden zwei Mal mit TBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit ein bis zwei Tropfen des Zweitantikörpers N-Histofine Simple Stain Mouse Max PO Rat bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden erneut zwei Mal mit TBS gewaschen und 100  $\mu$ L des Peroxidase-Substrats wurde auf die Schnitte pipettiert. Das Peroxidase-Substrat bestand aus 2,5 mL ddH<sub>2</sub>O-Wasser vermischt mit einem Tropfen Puffer, zwei Tropfen DAB und einem Tropfen Peroxide Solution. Der Färbeprozess wurde durch Spülen in Leitungswasser gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend für zehn Sekunden in eine Hematoxylinlösung getaucht, um die Zellkerne anzufärben. Überschüssiger Farbstoff wurde nachfolgend in Leitungswasser abgewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte wieder entwässert, indem die oben aufgeführte Reihe zur Deparaffinisierung rückwärts durchlaufen wurde. Direkt im Anschluss wurde zum Eindecken ein Deckglas mit Hilfe von Entellan® auf die Schnitte unter Ausübung von Druck geklebt. Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Vectra 3.0 Automated Quantitative Pathology Imaging System (Akoya Biosciences, Massachusetts, USA) betrachtet und repräsentative Aufnahmen mit Vectra® (Akoya Biosciences, Massachusetts, USA) gespeichert. Mit Hilfe des lernfähigen, automatisierten Algorithmus von inForm® Tissue Finder™ (Akoya Biosciences, Massachusetts, USA) und dem Bildauswertungsprogramm Phenochart® (Akoya Biosciences, Massachusetts, USA) wurden alle Zellen des Schnittes, welche positiv für F4/80 waren, gezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt.

## 2.8 Datenanalyse und Präsentation

Die präsentierten Messdaten zeigen jeweils den errechneten Mittelwert sowie den dazugehörigen Standardfehler des Mittelwerts ( $\pm$  SEM) von der gegebenen Anzahl (n) an unabhängigen Experimenten. Die Western Blot-Banden wurden quantitativ mit dem Programm ImageJ® ausgewertet, auf die Haushaltsgene  $\beta$ -Aktin oder GAPDH normalisiert und in Relation zur Kontrolle gesetzt. Die graphische Präsentation und statistische Auswertung wurden mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Ergebnisse von ELISA Versuchen wurden nach den Angaben der Hersteller ausgewertet.

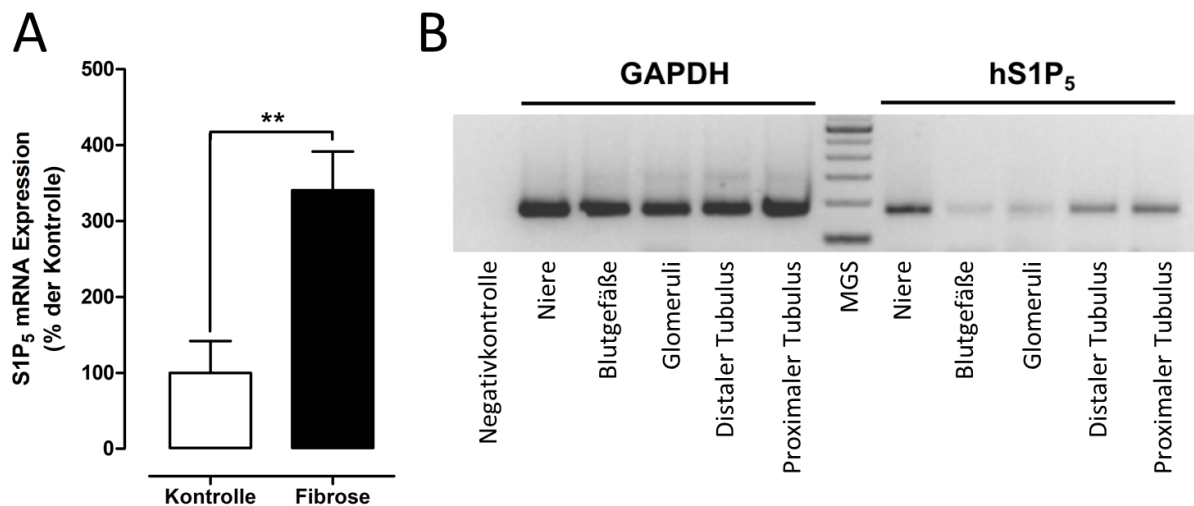
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung der Rolle des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors 5 (S1P<sub>5</sub>) in fibrotischen Nierenerkrankungen

S1P<sub>5</sub> ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor für S1P, der im gesunden Menschen hauptsächlich im Gehirn, im Knochenmark, in der Haut und in der Milz exprimiert wird (Im *et al.* 2000; Fagerberg *et al.* 2014). Die Aktivierung des Rezeptors erzeugt über die G-Proteine verschiedene Signale in der Zelle, welche die Proliferation, Migration, Gefäßtonus, Barrierefunktion und Zellkommunikation steuern können (Brinkmann 2007).

#### 3.1.1 S1P<sub>5</sub>-Expression ist erhöht in fibrotischem Nierengewebe

Es wurde bereits gezeigt, dass der profibrotische Faktor TGF- $\beta_2$  in der Lage ist, die Expression von S1P<sub>5</sub> in humanen Mesangiumzellen zu erhöhen (Wünsche *et al.* 2015). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die TGF- $\beta_2$ -induzierte Expression des profibrotischen Zytokins CTGF durch eine vorhergehende Herunterregulation von S1P<sub>5</sub> verhindert werden kann (Wünsche *et al.* 2015). Mit Hilfe von RT-qPCR konnte nun auch eine erhöhte Expression von S1P<sub>5</sub> in fibrotischem gegenüber nichtfibrotischem Gewebe aus der Niere von Patienten, die an einer Hydronephrose leiden, gemessen werden (Abbildung 11A). Zudem konnten Mitarbeiter von Prof. Dr. H. J. Gröne, dem Leiter der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie am DKFZ in Heidelberg, mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR die Expression von S1P<sub>5</sub> in der humanen Niere auf mRNA-Ebene nachweisen. Die höchste Expression wurde hierbei im Tubulussystem gemessen (Abbildung 11B).



**Abbildung 11: Genexpression von S1P<sub>5</sub> in humanen Nierenbiopsien.** **A:** RT-qPCR von S1P<sub>5</sub>-mRNA in nichtfibrotischem und fibrotischem Nierengewebe aus Patienten, die unter einer Hydronephrose litten. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM); \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 5$  (Kontrolle),  $n = 10$  (Fibrose). **B:** Vergleich der mRNA-Expression von humanem S1P<sub>5</sub> gegenüber der Referenz-mRNA GAPDH in verschiedenen Sektionen von humanem Nierengewebe. Die Abb. wurde von Prof. Dr. H. J. Gröne, dem Leiter der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie am DKFZ, zur Verfügung gestellt.

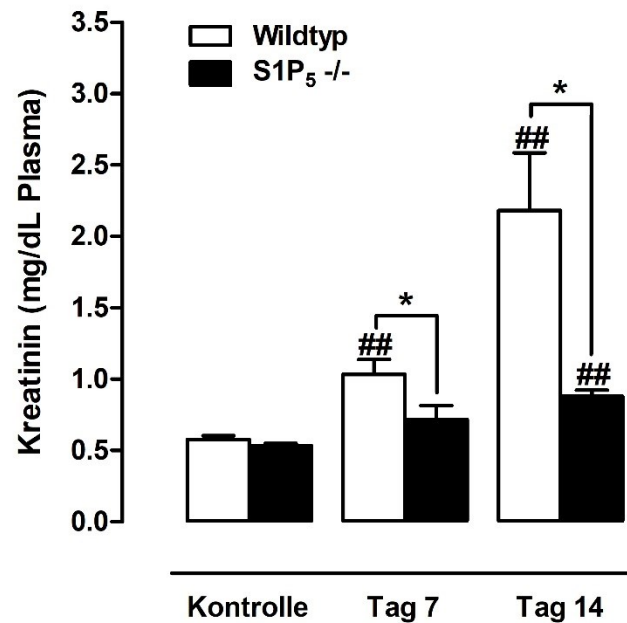
### 3.1.2 S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen mildereren Verlauf bei der Adenin-induzierten Nephropathie

Um die Rolle von S1P<sub>5</sub> in der Nierenfibrose weiter zu untersuchen, wurden S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse und Wildtypmäuse der Linie C57BL/6J in dem Modell der Adenin-induzierten Nephropathie (AN) eingesetzt.

Wildtyp- und S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse wurden für 7 und 14 Tage mit einer adeninreichen (0,25% Adenin) Nahrung gefüttert. Anschließend wurden die Mäuse schmerzfrei getötet, um Blut und Organe zu entnehmen. Mit Hilfe des aus dem Blut gewonnenen Plasmas wurde die Funktionalität der Nieren untersucht. Hierfür wurde mittels eines ELISAs die Kreatininkonzentration im Plasma bestimmt und davon die Nierenfunktion abgeleitet (Kuć *et al.* 2010). Die Kreatininkonzentrationen in den gesunden Tieren waren bei beiden Genotypen im Mittel bei 0,6 mg/dL (Wildtyp) und 0,5 mg/dL (S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>) (Abbildung 12). Nach 7 Tagen im AN-Modell verdoppelte sich die Kreatininkonzentration in den Wildtypmäusen auf einen Wert von 1 mg/dL wohingegen die Konzentration im Plasma der S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen nicht signifikant anstieg und einen Mittelwert von 0,7 mg/dL



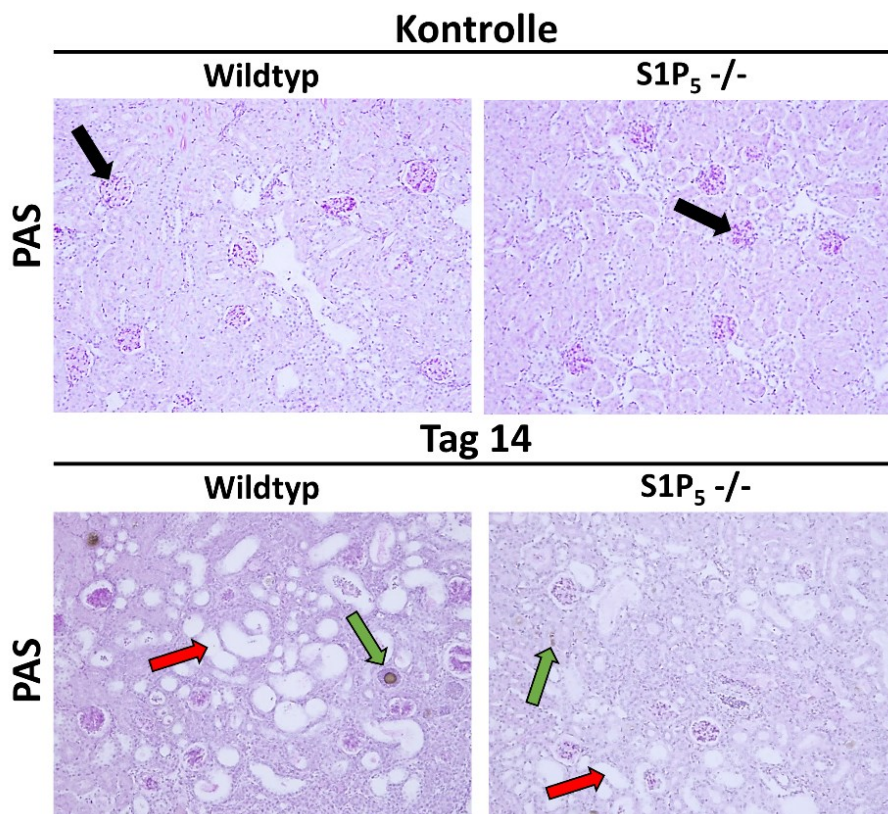
erreichte. Nach 14 Tagen im AN-Modell stieg die Kreatininkonzentration auf 2,2 mg/dL in den Wildtypmäusen an, in den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen lag der Wert hingegen bei 0,9 mg/dL (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Kreatininkonzentrationen im Plasma der Mäuse.** Die Nierenfunktion von Wildtyp und S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen wurde über die Kreatininkonzentration im Plasma überprüft. Verglichen wurden Proben von unbehandelten Mäusen (Kontrolle) und von Tieren, die 7 Tage oder 14 Tage mit adeninreicher Diät gefüttert wurden. Abgebildet sind Mittelwerte ± SEM; \*p < 0,01; ##p < 0,01 verglichen mit der gesunden Kontrolle; n = 7-9 (Kontrolle), n = 7 (Tag 7), n = 5 (Tag 14).

### 3.1.3 Untersuchung des Gewebeschadens

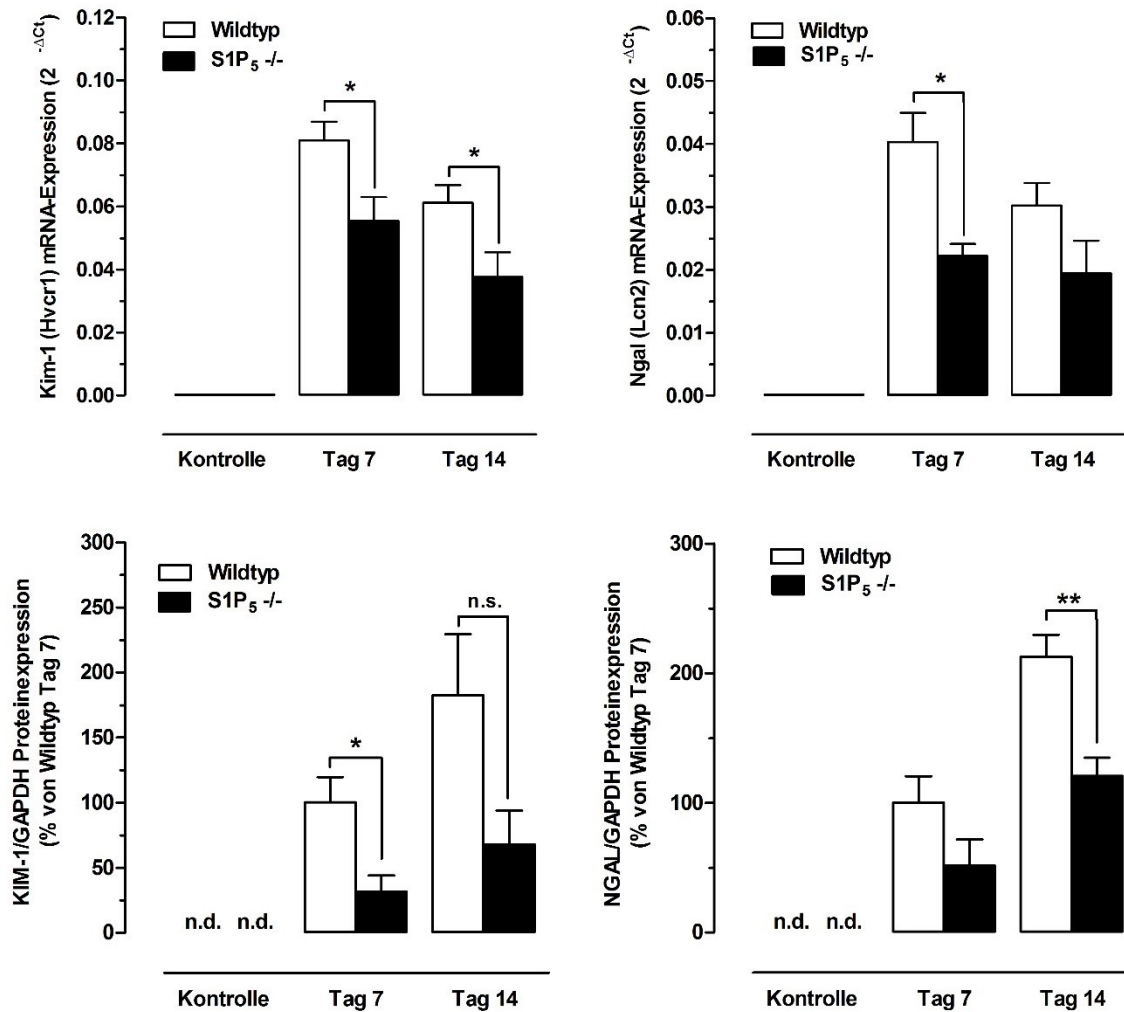
In den Nierenschnitten wurden mit Hilfe der PAS-Reaktion Kohlenhydrate der Zellbestandteile rosa bis magentafarben und die Zellkerne blau gefärbt, um die Zellen im Gewebe besser zu erkennen. In den Sektionen des Nierenkortex beider Genotypen wurden deutliche Schädigungen des Gewebes durch die Behandlung mit Adenin sichtbar (Abbildung 13). Zu sehen sind nekrotische Tubuluszellen und Tubulusdilatationen, welche zur Perforation des Gewebes führten. Im kranken Gewebe der Wildtypmäuse sind zudem auch die Glomeruli kleiner und verdichteter im Gegensatz zum gesunden Gewebe. An manchen Stellen sind die bernsteinfarbenen Dihydroxyadenin-Kristalle zu erkennen, welche meist von vielen Zellen umgeben sind, bei denen es sich um Makrophagen handeln könnte.



**Abbildung 13: Untersuchung auf Gewebeschäden in den Nieren.** Repräsentatives Bild der Färbung der Gewebeschnitte aus dem Nierenkortex mit PAS von Kontrollmäusen und Mäusen nach 14 Tagen im AN-Modell. Die Zellkerne sind blauviolett und die kreisförmig erscheinenden Glomeruli (schwarze Pfeile) sind zu erkennen. Nach 14 Tagen im AN-Modell ist das Gewebe von großen Löchern (rote Pfeile), Dilatationen der Tubuli, durchzogen und es werden an manchen Stellen die bernsteinfarbenen Kristalle aus 2,8-Dihydroxyadenin sichtbar (grüne Pfeile).

Die Schädigung des Gewebes wurde auch auf molekularer Ebene über eine Bestimmung der Expression von *Kidney injury molecule-1* (KIM-1) und *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. Diese Biomarker können einen akuten Nierenschaden anzeigen und sind bereits vor einem Anstieg des Serumkreatinins im Urin von Patienten nachweisbar (Han *et al.* 2002; Bolignano *et al.* 2008; Han *et al.* 2008; Nickolas *et al.* 2008; Lei *et al.* 2018). Es wird vermutet, dass die Expression von KIM-1 in Reaktion auf den Verlust von Zell-Zell-Kontakten, welche dem Zelltod vorangehen, stattfindet (Prozialeck *et al.* 2009). NGAL wird ebenfalls bei einem Nierenschaden exprimiert und soll verhindern, dass Zellen des Tubulussystems in Apoptose gehen (Mishra *et al.* 2004; An *et al.* 2013; Han *et al.* 2018).

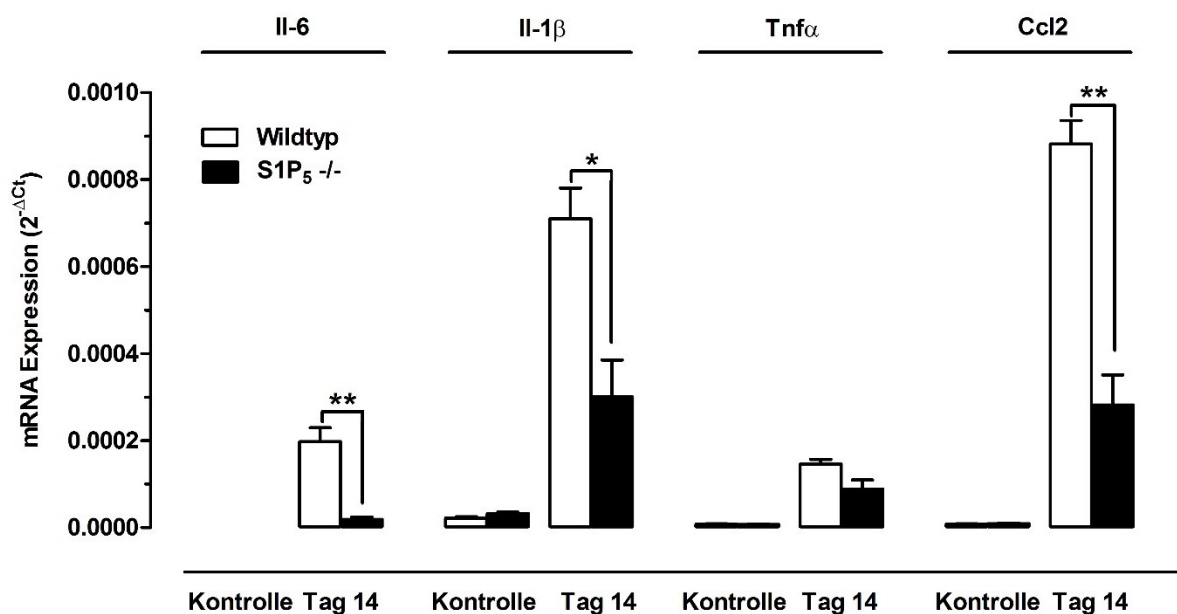
Die mRNA-Expression in der Niere wurde mittels RT-qPCR (TaqMan®) quantifiziert und die Proteinexpression per Western Blot bestimmt. Die Expression der beiden Proteine, wie auch die der jeweiligen korrespondierenden mRNA, wurde durch die AN nach 7 und auch nach 14 Tagen induziert, wohingegen in den gesunden Tieren keine Expression detektiert werden konnte (Abbildung 14). In Relation zu den Wildtypen war die Expression von Kim-1 sowohl nach 7 als auch nach 14 Tagen signifikant geringer in den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusenieren. Die Genexpression von NGAL war hingegen nur nach 7 Tagen im AN-Modell signifikant geringer in den Nieren der S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse gegenüber den Wildtypen. Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass die Expression von KIM-1 nach 7 Tagen aber nicht nach 14 Tagen im AN-Modell signifikant geringer war in den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusenieren gegenüber den Wildtypen. Umgekehrt war die Expression von NGAL erst nach 14 Tagen im AN-Modell signifikant geringer in den Nieren der S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse gegenüber den Wildtypen.



**Abbildung 14: Expression von Nierenschädigungsmarkern.** Die mRNA-Level und Protein-Level von Nierenschädigungsmarkern wurde in Nierenproben von gesunden Kontrollmäusen und Mäusen nach 7 und 14 Tagen im AN-Modell gemessen und ausgewertet. **Oben:** Analyse der RT-qPCR zur Bestimmung der Genexpression von Kim-1 und Ngal. **Unten:** Quantitative Auswertung der Western Blots von KIM1 und NGAL im Verhältnis zum Haushaltsprotein GAPDH zur Bestimmung der Proteinmengen. Abgebildet sind Mittelwerte der berechneten Konzentrationen  $\pm$  SEM. Genexpression: n = 7-9 (Kontrolle), n = 7 (Tag 7), n = 5 (Tag 14). Proteineexpression: alle n = 5; n.d. = nicht detektiert; n.s. = nicht signifikant \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

### 3.1.4 Untersuchung von Entzündungsmarkern

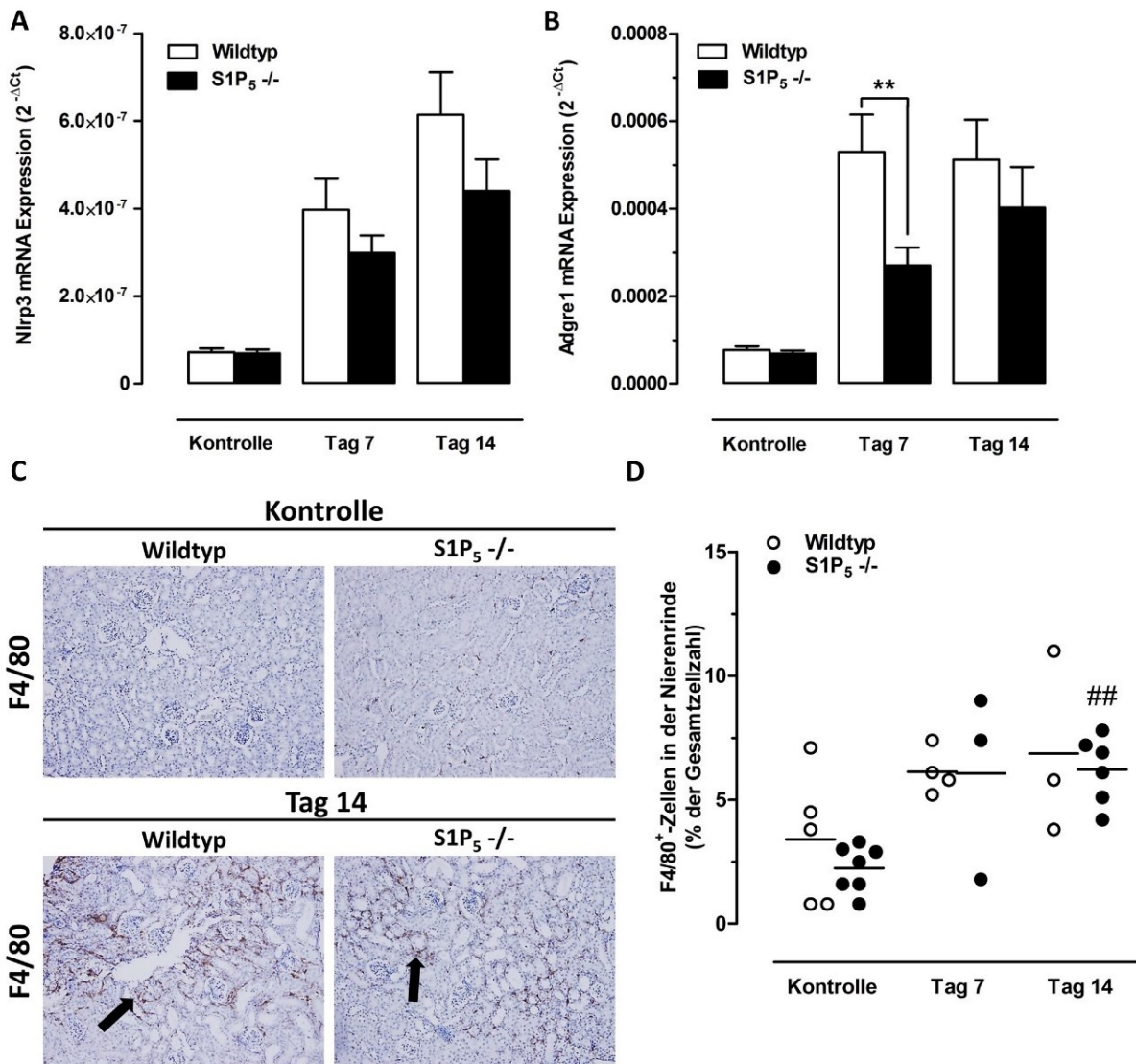
Durch die Bildung von Kristallen im Nierengewebe wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen. Aus diesem Grund wurde die Genexpression von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen in den Nieren untersucht. Die mRNA-Konzentrationen Ccl2, Il-6, Tnf $\alpha$  und Il-1 $\beta$  wurden durch die AN in allen Mäusen induziert. Die Expression der genannten Zytokine war in den S1P $_5^{-/-}$ -Mäusen jedoch signifikant geringer im Vergleich zu den Wildtypen sowohl nach 7 Tagen als auch nach 14 Tagen mit AN, mit der Ausnahme von Il-1 $\beta$  nach 7 Tagen (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Genexpression proinflammatorischer Zytokine.** Mittels RT-qPCR wurden die mRNA-Level von Il-6, Il-1 $\beta$ , Tnf $\alpha$  und Ccl2 in den Nierenproben von gesunden Mäusen und Mäusen nach 14 Tagen im Modell der AN gemessen und ausgewertet. Abgebildet sind Mittelwerte der berechneten Konzentrationen  $\pm$  SEM; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; n = 7-9 (Kontrolle), n = 5 (Tag 14).

Zusätzlich wurde auch die Infiltration bzw. Proliferation von renalen mononukleären Phagozyten (Makrophagen und dendritische Zellen) in Folge der Expression der proinflammatorischen Zytokine überprüft. Gewebeschnitte der Niere wurden mit einem Antikörper gegen das Oberflächenprotein F4/80 (auch bekannt als EMR1), welches exklusiv auf mononukleären Phagozyten exprimiert wird, gefärbt (Abbildung 16D). Nach der Färbung wurden von den Nierenschnitten alle Kortexregionen mit Hilfe von

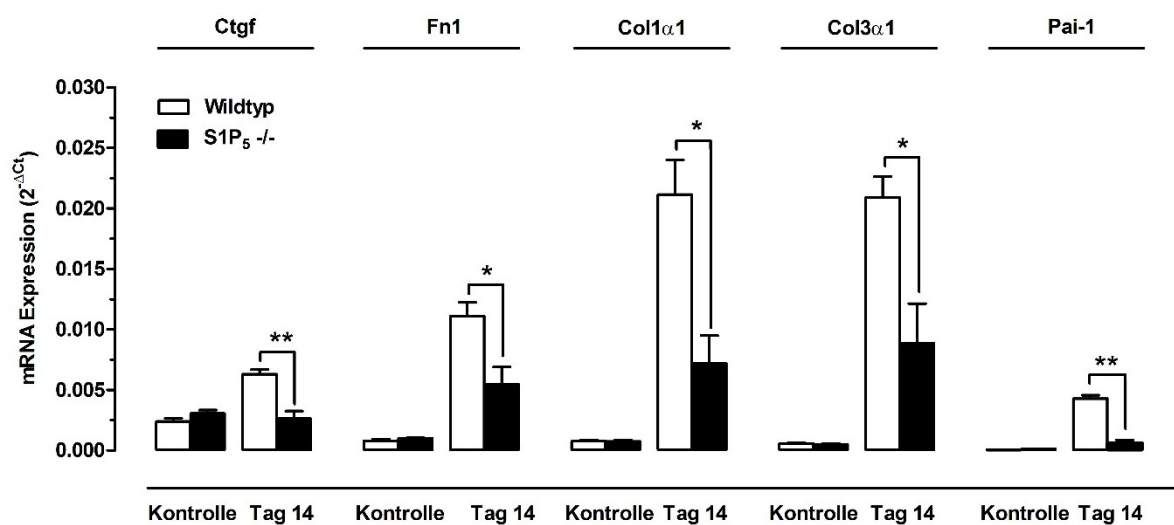
Vectra® als Einzelbilder gesichert. Die positive Färbung für F4/80 (braun) in Kombination mit Nachweis des Zellkerns durch DAPI (blau) wurde mit Hilfe des Programms inForm® Tissue Finder™ als „ein mononukleärer Phagozyt“ definiert und dem Algorithmus antrainiert. Daraufhin konnten die mononukleären Phagozyten in der kompletten Nierenrinde aller gefärbten Schnitte automatisch gezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt werden (Abbildung 16C). Es konnte eine starke Infiltration der Gewebe bzw. Proliferation im Gewebe von mononukleären Phagozyten bei AN festgestellt werden, welche aber in ihrer Ausprägung unabhängig vom Genotyp der Mäuse waren. Diese Beobachtung wurde gestützt durch die Messung der Genexpression von *adhesion G protein-coupled receptor E1* (Adgre1), ein Gen, welches für den Rezeptor EMR1 kodiert und ebenfalls in beiden Genotypen gleichermaßen stark durch die AN nach 14 Tagen induziert wurde (Abbildung 16B). An Tag 7 war die Genexpression von Adgre1 in den Wildtypen schon auf dem maximalen Niveau angekommen, wohingegen in den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen zu diesem Zeitpunkt die Expression nur halb so stark war, was zu einem signifikanten Unterschied führte. Die Aktivität der Makrophagen kann zusätzlich noch über Aktivierung des Inflammasoms bestimmt werden. Hierfür wurde die Genexpression der Inflammasomkomponente *nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain-containing 3 gene* (Nlrp3) gemessen (Abbildung 16A). Auch hier konnten keine Unterschiede in der Expression in den erkrankten Mäusen zwischen den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypmäusen festgestellt werden.



**Abbildung 16: Untersuchung der Nieren auf mononukleäre Phagozyten. A+B:** Genexpression von Nlrp3 und Adgre1 in den Nierenproben von gesunden Mäusen und Mäusen nach 7 und 14 Tage im Modell der AN; n = 7-9 (Kontrolle), n = 7 (Tag 7), n = 5 (Tag 14). **C:** Repräsentatives Bild der immunhistochemischen Färbung gegen das Epitop F4/80 (braun, schwarze Pfeile) im Gewebeschnitt aus dem Nierenkortex von Kontrollmäusen und Mäusen nach 14 Tagen im AN-Modell. **D:** Auswertung der F4/80-Färbungen im Nierenkortex. n = 5-7 (Kontrolle), n = 3-4 (Tag 7), n = 3-6 (Tag 14). Abgebildet sind die Mittelwerte als Datenpunkte aus den Messungen von mehreren gefärbten Nierenschnitten; \*\*p < 0,01; ##p < 0,01 verglichen mit der gesunden Kontrolle des gleichen Genotyps.

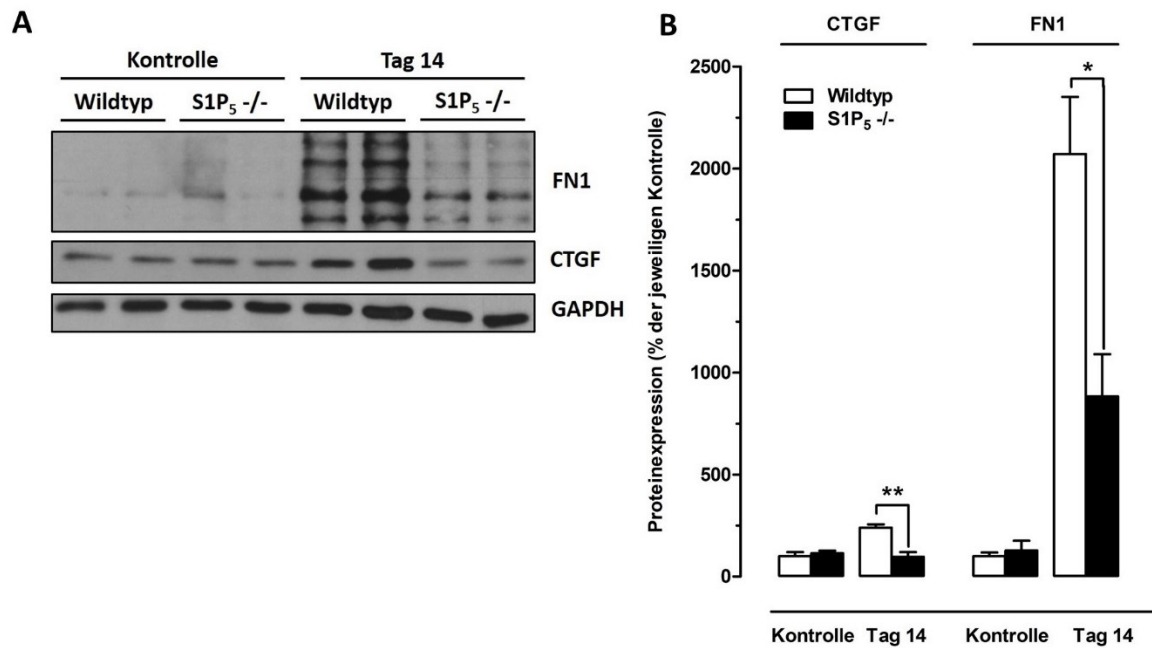
### 3.1.5 Untersuchung der Nieren auf Fibrose

Durch die AN wurde die Genexpression von einigen Fibrosemarkern induziert. Ähnlich wie bei den Ergebnissen zur Entzündung war auch die Expression der Fibrosemarker in den  $S1P_5^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen verringert. Aus der RT-qPCR-Analyse ging hervor, dass die Konzentrationen von Ctgf, Fn1, Col1 $\alpha$ 1, Col3 $\alpha$ 1, Pai-1/Serpine1 und Acta-2/ $\alpha$ SMA nach 14 Tagen im AN-Modell signifikant niedriger waren (Abbildung 17A). Die Expression des profibrotischen Wachstumsfaktors CTGF und des Matrixproteins FN1 wurde zusätzlich noch auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht (Abbildung 17B). Nach densitometrischer Quantifikation der Proteinbanden wurde festgestellt, dass die Proteinexpression von CTGF und FN1 in den  $S1P_5^{-/-}$ -Mäusen nach 14 Tagen im AN-Modell im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant niedriger war (Abbildung 17C).



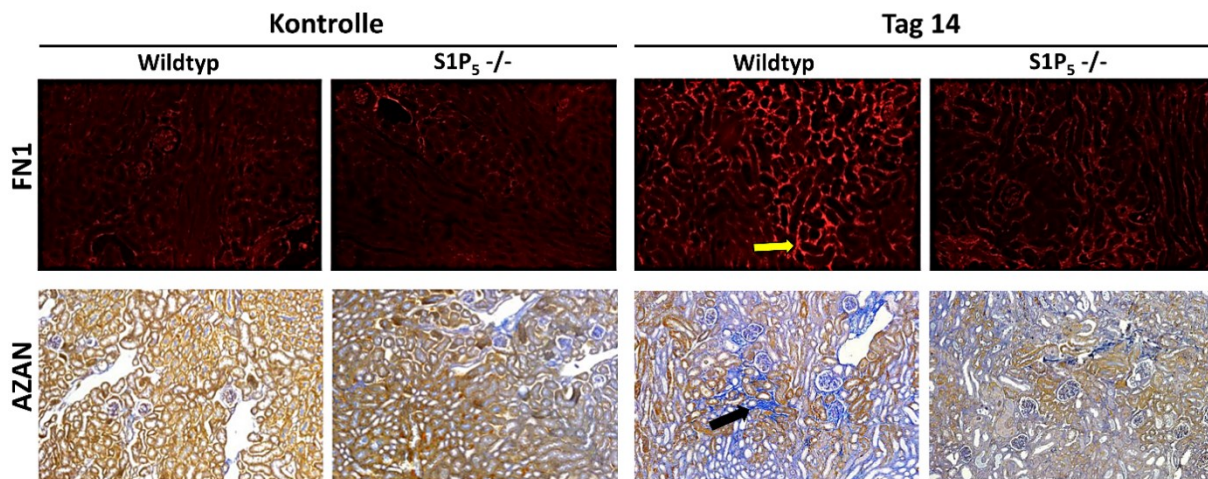
**Abbildung 17: Genexpression von Fibrosemarkern in den Nieren.** Genexpression von Ctgf, Fn1, Col1 $\alpha$ 1, Col3 $\alpha$ 1 und Pai-1 ermittelt via RT-qPCR in den Nierenproben von gesunden Mäusen und Mäusen, die 14 Tage im AN-Modell waren. Wildtyp: Kontrolle: n = 9, Tag 14: n = 5;  $S1P_5^{-/-}$ : Kontrolle: n = 7, Tag 14: n = 5.





**Abbildung 18: Proteinexpression von Fibrosemarkern in den Nieren.** **A:** Repräsentativer Western Blot von FN1 und CTGF und dem Referenzprotein GAPDH. **B:** Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse von CTGF und FN1. Abgebildet sind Mittelwerte der berechneten Konzentrationen  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 7-9$  (Kontrolle),  $n = 5$  (Tag 14).

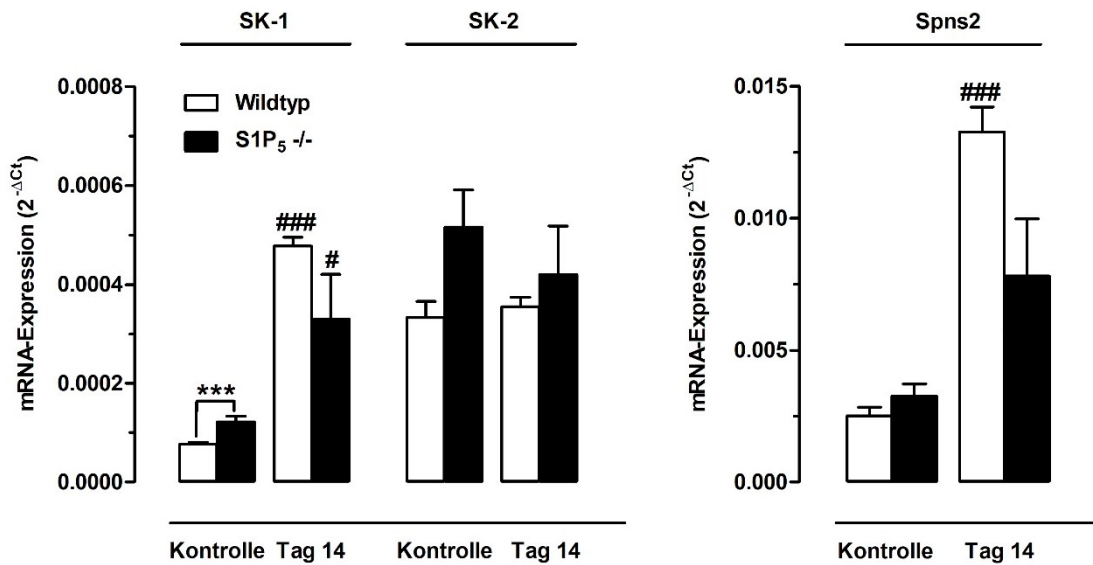
Des Weiteren wurden Gewebeschnitte aus der Niere auf die Expression von fibrotischen Markern untersucht. Es wurde sowohl ein immunchemischer Nachweis von Fibronectin als auch eine Färbung des Bindegewebes mittels AZAN durchgeführt (Abbildung 19). Die Färbungen dieser Fibrosemarker waren in S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen nach 14 Tagen im AN-Modell weniger stark ausgeprägt im Vergleich zu den Wildtypen.



**Abbildung 19: Fibrose im Nierengewebe von Kontrollmäusen und AN-Mäusen.** Repräsentatives Bild der immunhistochemischen Färbung von Fibronektin (leuchtend rot, gelber Pfeil) und der Färbung von Bindegewebe (dunkel blau, schwarzer Pfeil) mittels AZAN in Gewebeschnitten aus dem Nierenkortex von Kontrollmäusen und Mäusen nach 14 Tagen im AN-Modell. Das Bild wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Gauer vom Universitätsklinikum Frankfurt am Main.

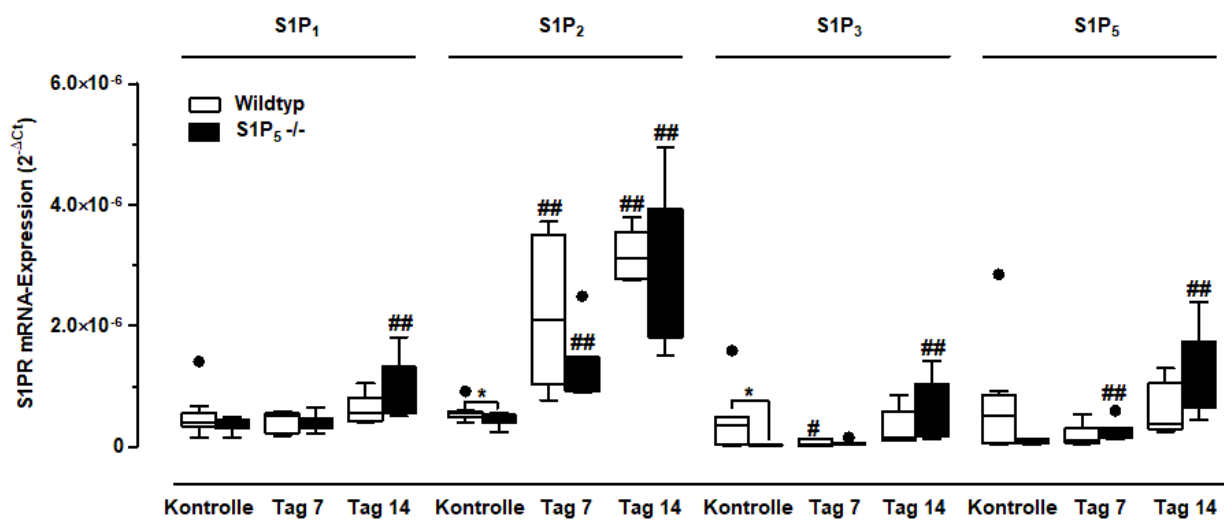
### 3.1.6 Untersuchung des Sphingolipidmetabolismus

Die Genexpression der SK-1 war nach 14 Tagen im AN-Modell sowohl in den  $S1P_5^{-/-}$ -Mäusen als auch in den Wildtypmäusen gegenüber den jeweiligen gesunden Kontrollen signifikant erhöht (Abbildung 20). Die Genexpression der SK-2 war höher im Vergleich zur SK-1 in den  $S1P_5^{-/-}$ -Mäusen und Wildtypmäusen und wurde durch die AN nicht signifikant verändert. Die mRNA-Menge des S1P-Transporters Spns2 war in kranken Mäusen beider Genotypen gegenüber den gesunden Kontrollen signifikant erhöht. Die Expression von SK-1 und Spns2 ist wichtig für die Synthese und den Export von S1P und begünstigt folglich die Aktivierung der S1P-Rezeptoren, wodurch diese einen Einfluss auf den Verlauf der Krankheit ausüben können.



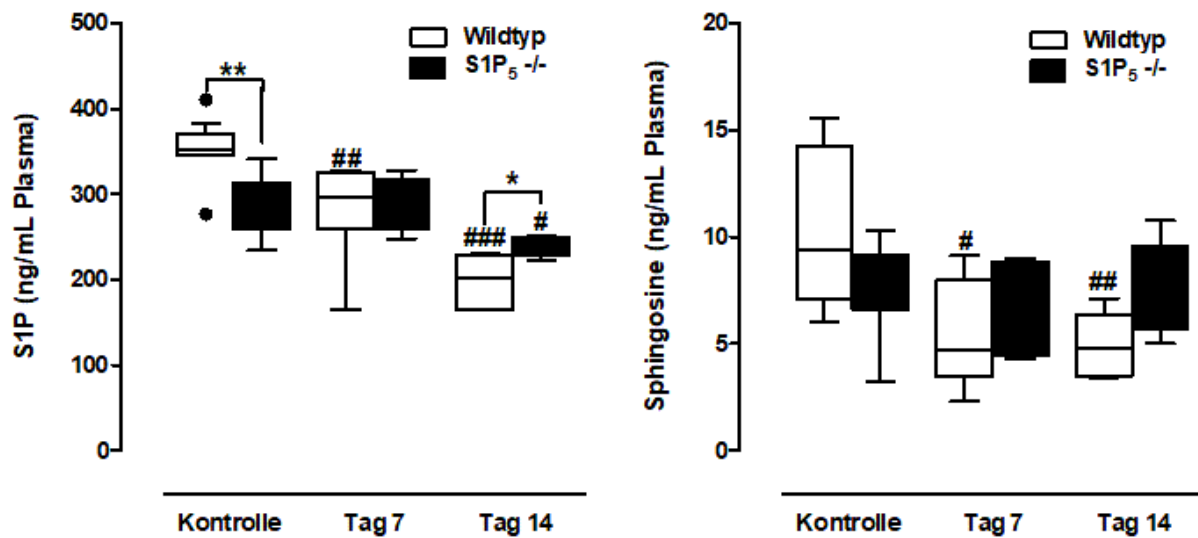
**Abbildung 20: Genexpression der Spingosinkinasen 1 und 2 und des S1P-Transporters Spns2 in den Nieren der gesunden und nierenkranken Mäuse.** Mittels RT-qPCR wurden die mRNA-Level von SK-1, SK-2 und Spns2 in den Nierenproben von gesunden Mäusen und Mäusen nach 14 Tagen im Modell der AN gemessen und ausgewertet. Abgebildet sind Mittelwerte der berechneten Konzentrationen  $\pm$  SEM. Wildtyp: n = 9 (Kontrolle), n = 5 (Tag 14); S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>: n = 7 (Kontrolle), n = 5 (Tag 14); \*\*\*p < 0,001; #p < 0,05 und ###p < 0,001 verglichen mit der jeweiligen gesunden Kontrollgruppe.

Die Expression der S1P-Rezeptoren war bei den gesunden S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen etwas niedriger als bei den Wildtypen (Abbildung 21). Nach 14 Tagen im AN-Modell wurden jedoch keine Unterschiede in der Genexpression der Rezeptoren zwischen den Genotypen gefunden. Durch die AN wurden insbesondere die Konzentrationen von S1P<sub>2</sub> in den Nieren verändert und es wurden im Durchschnitt 6-fach höhere Level dieses Rezeptors im Vergleich zu den gesunden Kontrollen gemessen. Die Expressionslevel von S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub> und S1P<sub>5</sub> weisen ein ähnliches Muster auf, sind jedoch insgesamt im Krankheitsverlauf kaum verändert. Auffällig ist, dass auch in den Nieren der S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen ein Anstieg des Signals für S1P<sub>5</sub> gemessen wurde, welches sogar höher ist als die Expression der anderen S1P-Rezeptoren in den gesunden Kontrollen. Die Unterscheidung des Genotyps scheint also über RT-qPCR mit der verwendeten Sonde nicht möglich und zeigt falschpositive Ergebnisse.



**Abbildung 21: Genexpression der S1P-Rezeptoren.** Mittels RT-qPCR wurden die mRNA-Level von S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> in den Nierenproben von gesunden Mäusen und Mäusen nach 14 Tagen im Modell der AN gemessen und ausgewertet. Die Daten sind dargestellt als Box-Plots nach Tukey mit Ausreißern (Punkte). Wildtyp: n = 9 (Kontrolle), n = 5 (Tag 14); S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>: n = 7 (Kontrolle), n = 5 (Tag 14); \*p < 0,05; ##p < 0,01 verglichen mit der gesunden Kontrolle.

Mittels Massenspektrometrie wurde gemessen, dass S1P- und Sphingosin-Konzentrationen im Plasma von Wildtypmäusen nach 7 und 14 Tagen signifikant gegenüber gesunden Kontrollen sanken (Abbildung 22). Im Gegensatz dazu wurden keine Veränderungen der Konzentration von Sphingosin im Plasma von S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen gemessen. Die Konzentration von S1P im Plasma von S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen war erst nach 14 Tagen verringert. Generell waren die S1P-Level von gesunden S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen niedriger als in gesunden Wildtypmäusen. Dieses Verhältnis wurde durch das starke Abfallen der S1P-Konzentrationen in Wildtypen nach 14 Tagen im AN-Modell umgekehrt

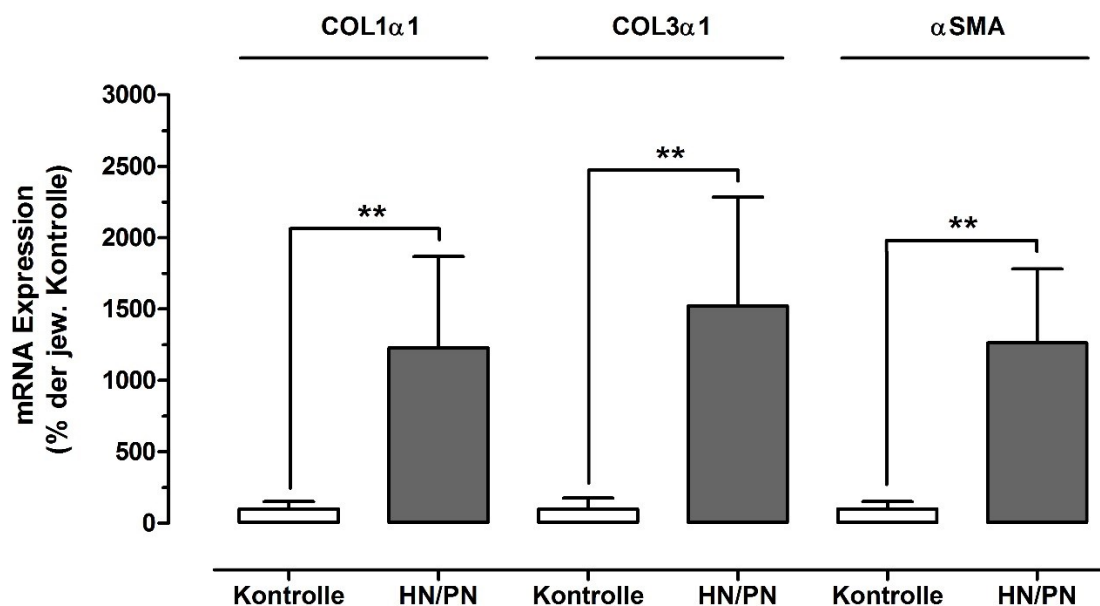


**Abbildung 22: Plasmaspiegel von S1P und Sphingosin in gesunden und nierenkranken Mäusen.** S1P- und Sphingosin-Plasmaspiegel wurden mit Hilfe von Massenspektrometrie, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, ermittelt. Die Daten sind dargestellt als Box-Plots nach Tukey mit Ausreißern (Punkte). (n = 5-9); \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; #p < 0,05; ##p < 0,01 und ###p < 0,001 verglichen mit der gesunden Kontrolle.

## 3.2 Untersuchung der Veränderungen von kettenlängen-spezifischen Ceramiden in fibrotischen Nieren

### 3.2.1 Veränderungen der Konzentrationen von Ceramiden in humanen Nierenrinden bei Fibrose

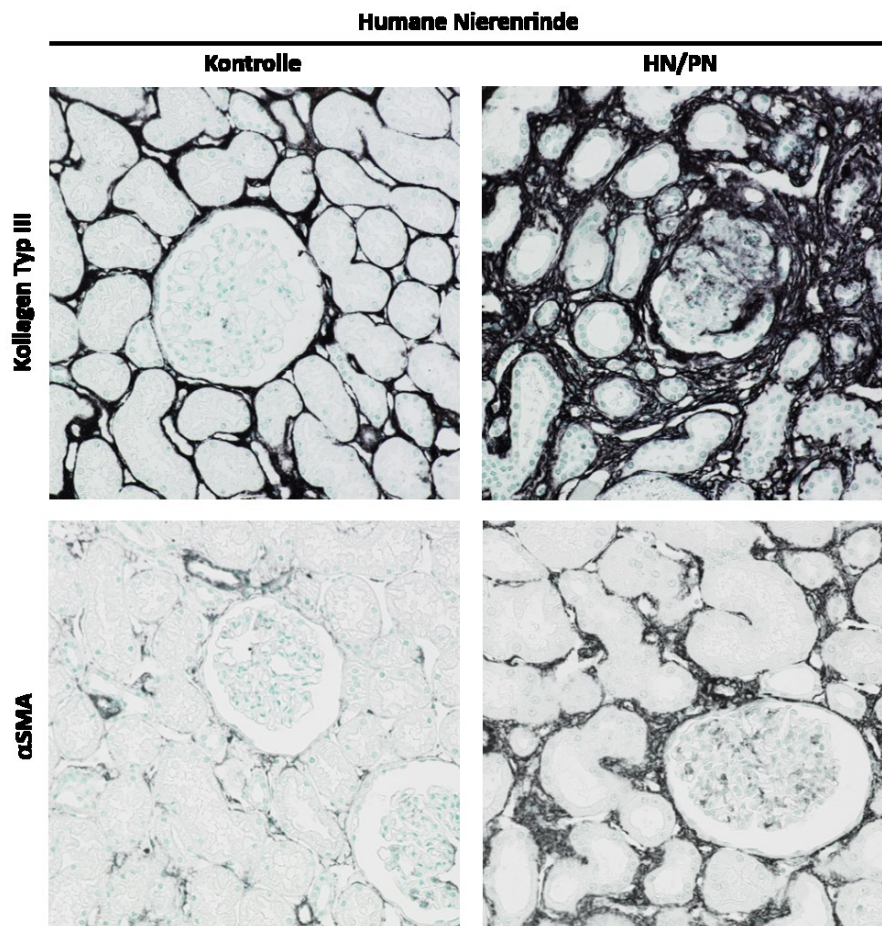
Zu Beginn wurden alle Nierenbiopsien auf die Ausprägung einer Fibrose anhand der Expression von klassischen Fibrosemarkern untersucht. Mittels Real-Time PCR wurde in den Nierenrindenbiopsien der Hydronephrose- bzw. Pyelonephritispatienten eine 10- bis 15-fache Erhöhung der mRNA-Expression von Kollagen Typ I, alpha 1 (COL1 $\alpha$ 1), Kollagen Typ III, alpha 1 (COL3 $\alpha$ 1) und *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA) gemessen (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in den fibrotischen und gesunden Kortextgewebeproben.** Es wurde die Expression von Kollagen Typ 1, alpha I (COL1 $\alpha$ 1), Kollagen Typ III, alpha 1 (COL3 $\alpha$ 1), *alpha smooth muscle cctin* ( $\alpha$ SMA) gemessen. Die Expression in den Proben der Hydronephrose-/Pyelonephritis-(HN/PN) Patienten wurde in Relation zu den Kontrollproben gesetzt und der Mittelwert mit Standardfehler ( $\pm$  SEM) in % abgebildet; \*\*p < 0,01; n = 6 (Kontrolle), n = 8 (HN/PN).

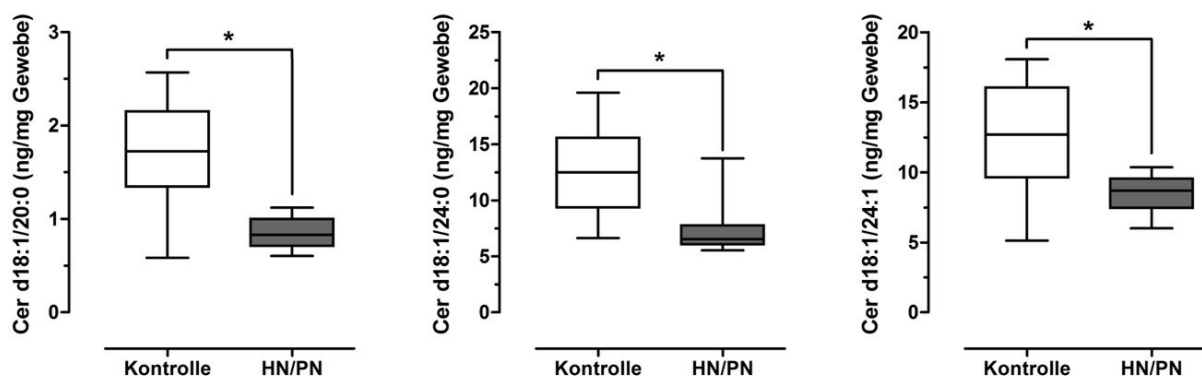
Zusätzlich wurden auch mittels immunhistochemischer Analyse die Expression des extrazellulären Matrixproteins Kollagen III und des Fibroblastenmarkers  $\alpha$ SMA in den Biopsien von den Kooperationspartnern Dr. Sonja Djudjaj und Prof. Dr. Peter Boor vom Universitätsklinikum der RWTH Aachen untersucht (Abbildung 24). Auch hier wurde

eine deutlich stärkere Färbung aufgrund einer erhöhten Expression von Kollagen III und  $\alpha$ SMA und somit sowohl eine Nierenfibrose als auch eine erhöhte Myofibroblasten-Aktivierung bei den Schnitten der Patienten mit Hydronephrose bzw. Pyelonephritis detektiert.



**Abbildung 24: Immunohistochemische Färbungen des humanen Nierenkortex.** Antikörperbasierte Färbungen von Kollagen III und  $\alpha$ SMA in Biopsien aus dem Nierenkortex von Patienten, die zum Zeitpunkt der Entnahme an Hydronephrose oder Pyelonephritis (HN/PN) litten und in tumorfreien Nierenkortexproben von Patienten, an denen eine Tumornephrektomie durchgeführt worden war (Kontrolle). Die gefärbten Proteine sind dargestellt in schwarz und die Zellkerne in blau. Das Bild wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Sonja Djudjaj vom Universitätsklinikum der RWTH Aachen.

Als Nächstes wurden die Ceramidkonzentrationen in den Gewebeproben mit Hilfe von LC-ESI-MS/MS gemessen (Abbildung 25). Dabei wurde deutlich, dass die sehr langkettigen Ceramide Cer d18:1/20:0, Cer d18:1/24:0 und Cer d18:1/24:1 in den Hydronephrose-/Pyelonephritis-Proben gegenüber den gesunden Gewebeproben aus dem Nierenkortex signifikant niedriger konzentriert waren. Der Median von Cer d18:1/20:0 war im fibrotischen Nierenkortex um etwa 50% niedriger im Vergleich zum gesunden Gewebe. Die Werte von Cer d18:1/24:0 und Cer d18:1/24:1 waren ebenfalls um ca. 30% niedriger. Die Konzentrationen der langkettigen Ceramide Cer d18:1/16:0 und Cer d18:1/18:0 sowie die der sehr langkettigen Dihydroceramide Cer d18:0/24:0 und Cer d18:0/24:1 waren hingegen nicht signifikant verändert.

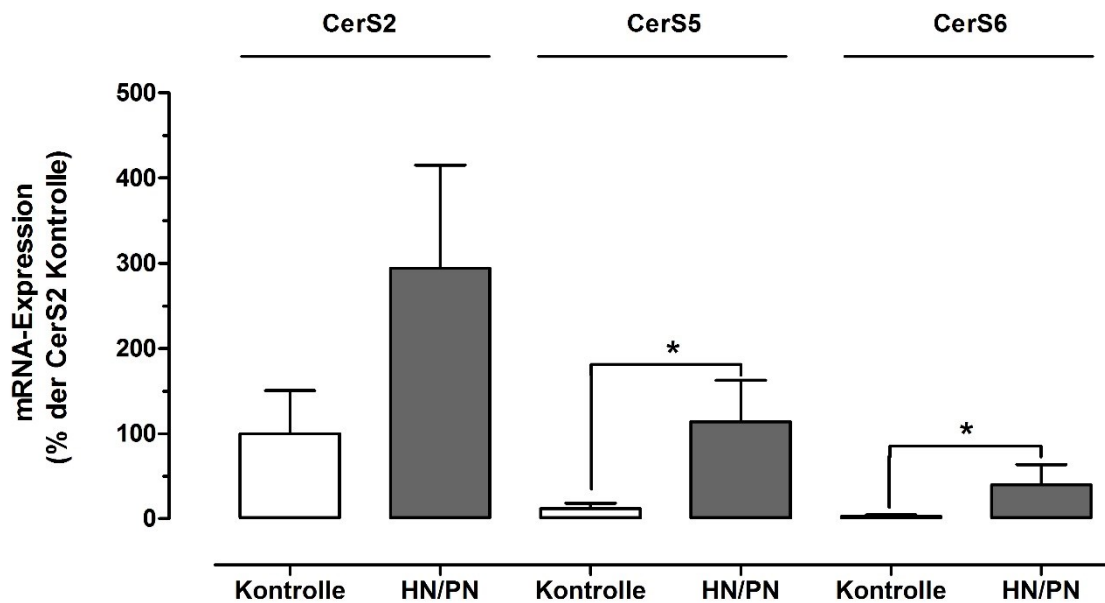


Ceramide (Cer)	Kontrolle	HN/PN	p-Wert
Cer d18:1/16:0	2,8 (2,3-4,0)	3,3 (2,3-3,9)	0,755
Cer d18:1/18:0	1,1 (0,7-1,5)	0,7 (0,6-1,0)	0,108
Cer d18:0/24:0	0,6 (0,4-0,7)	0,5 (0,5-0,5)	0,108
Cer d18:0/24:1	0,8 (0,6-0,9)	0,6 (0,6-0,8)	0,284

**Abbildung 25: Konzentration von Ceramiden bestimmter Kettenlänge im menschlichen Nierenkortex.** In Biopsien aus dem Nierenkortex von Patienten, die zum Zeitpunkt der Entnahme an Hydronephrose oder Pyelonephritis (HN/PN) litten und in tumorfreien Nierenkortexproben von Patienten, an denen eine Tumornephrektomie durchgeführt worden war (Kontrolle), wurden mittels LC-ESI-MS/MS, wie im Methodenteil beschrieben, Ceramide gemessen. Abgebildet sind die Interquartilsabstände sowie Median mit Minimum und Maximum in ng/mg Gewebe; \*p < 0,05; n = 6 (Kontrolle), n = 8 (HN/PN).



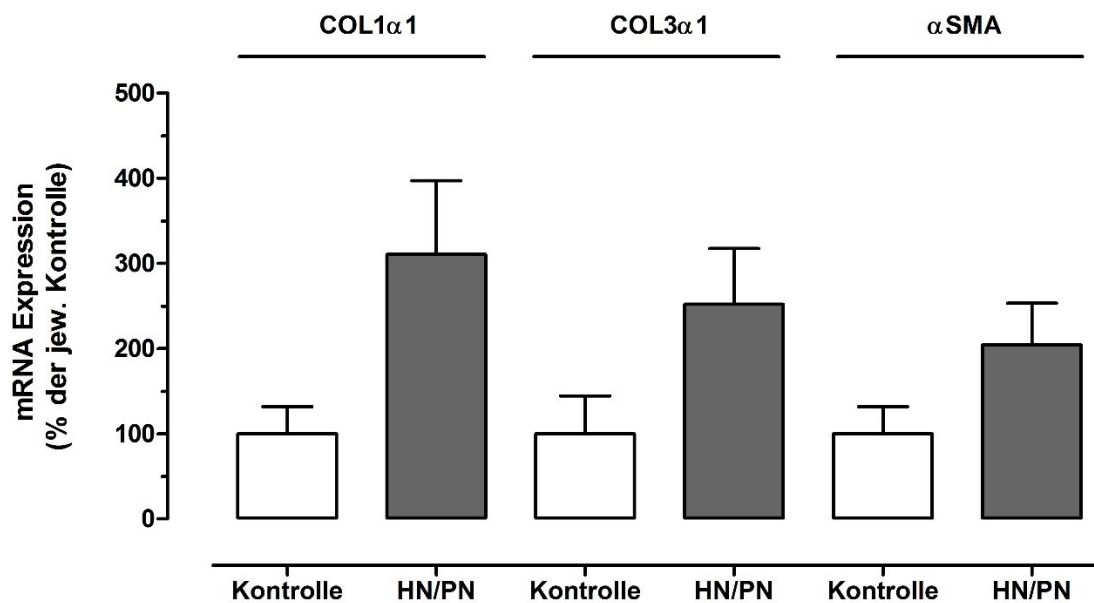
Im nächsten Schritt wurde die Genexpression der drei in den Nieren relevanten Ceramidsynthasen CerS2, CerS5 und CerS6 mittels Real-Time PCR gemessen (Abbildung 26). Die Genexpression von allen drei Ceramidsynthasen war in den Gewebeproben der HN/PN-Patienten höher im Vergleich zur Expression in gesunden Gewebeproben. Die Genexpression von CerS2 war 8-mal höher als die von CerS5 und 38-mal höher als die von CerS6 in den gesunden Gewebeproben.



**Abbildung 26: Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in den fibrotischen und gesunden Kortextgewebeproben.** Es wurde die Expression von Ceramidsynthase 2 (CerS2), Ceramidsynthase 5 (CerS5) und Ceramidsynthase 6 (CerS6) gemessen. Die Expression in den Proben der HN/PN-Patienten wurde in Relation zu den Kontrollproben gesetzt und der Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet; \* $p < 0,05$ ;  $n = 6$  (Kontrolle),  $n = 8$  (HN/PN).

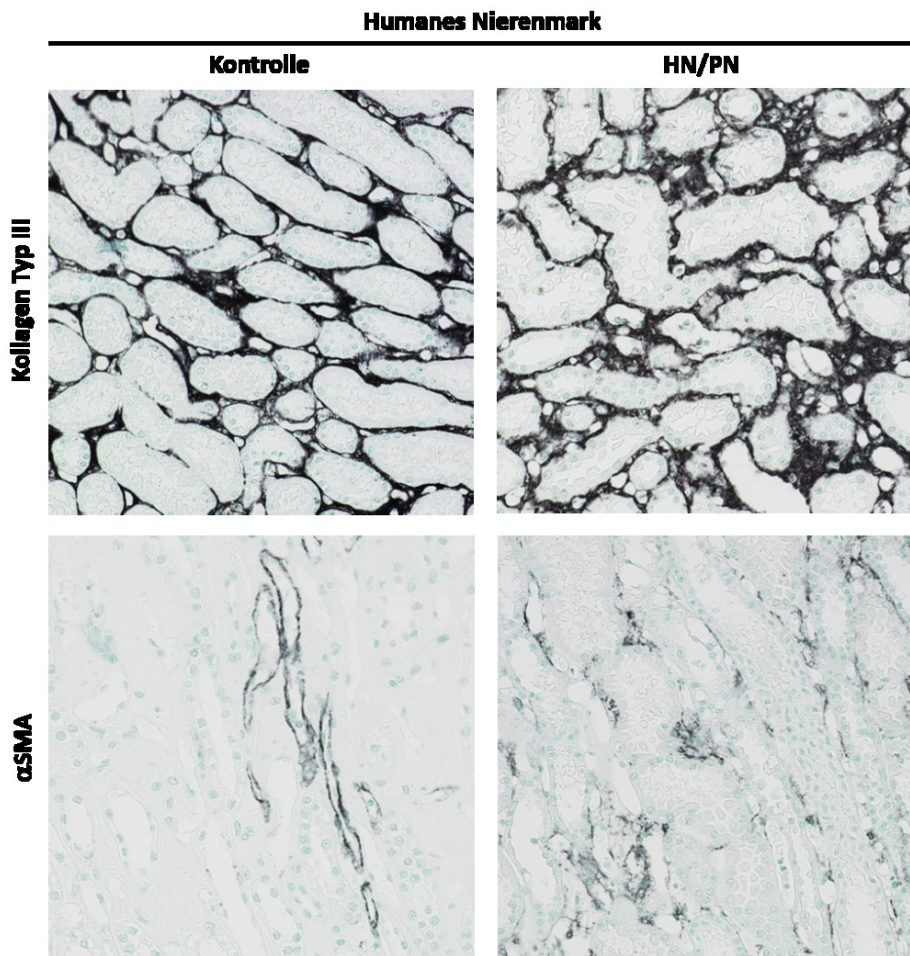
### 3.2.2 Veränderungen der Konzentrationen von Ceramiden in humanem Nierenmark bei Fibrose

Im Gegensatz zur Nierenrinde wurde im Nierenmark der Hydronephrose- bzw. Pyelonephritispatienten kein signifikanter Anstieg von COL1 $\alpha$ 1, COL3 $\alpha$ 1 und  $\alpha$ SMA auf mRNA-Ebene gegenüber den Kontrollen gemessen (Abbildung 27).



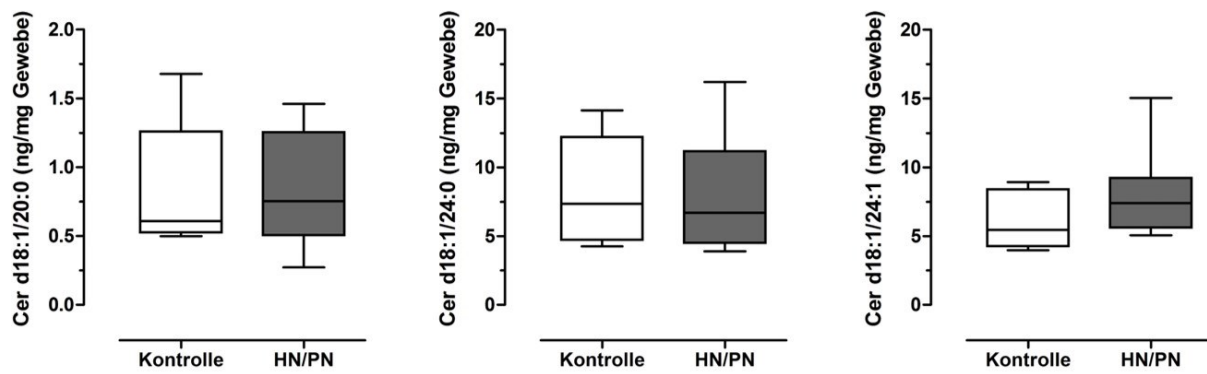
**Abbildung 27: Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in den fibrotischen und gesunden Nierenmarkgewebeproben.** Es wurde die Expression von Kollagen Typ I, alpha 1 (COL1 $\alpha$ 1), Kollagen Typ III, alpha 1 (COL3 $\alpha$ 1), *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA) gemessen. Die Expression in den Proben der HN/PN Patienten wurde in Relation zu den Kontrollproben gesetzt und der Mittelwert  $\pm$  SEM in % abgebildet; n = 5 (Kontrolle), n = 9 (HN/PN).

Bei der Färbung von Kollagen III und  $\alpha$ SMA in den Gewebeschnitten fielen die Unterschiede zwischen den Schnitten der gesunden Kontrollen und den HN/PN-Schnitten im Vergleich zum Nierenkortex geringer aus (Abbildung 28). Dennoch konnte festgestellt werden, dass die kollagenhaltige Schicht im Interstitium stärker ausgeprägt war. Zusätzlich zeigte die Färbung, dass die Expression von  $\alpha$ SMA in den gesunden Geweben nur in den Gefäßen zu sehen ist, wohingegen sie in den HN/PN-Schnitten auch tubulointerstitiell zu erkennen ist.



**Abbildung 28: Immunhistochemische Färbungen des humanen Nierenmarks.** Antikörperbasierte Färbungen von Kollagen Typ III und  $\alpha$ SMA in Biopsien aus der *medulla renalis* von Patienten, die zum Zeitpunkt der Entnahme an Hydronephrose oder Pyelonephritis (HN/PN) litten und in tumorfreien Nierenmarkproben von Patienten, an denen eine Tumornephrektomie durchgeführt worden war (Kontrolle). Die gefärbten Proteine sind dargestellt in schwarz und die Zellkerne in blau. Das Bild wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Sonja Djudjaj vom Universitätsklinikum der RWTH Aachen.

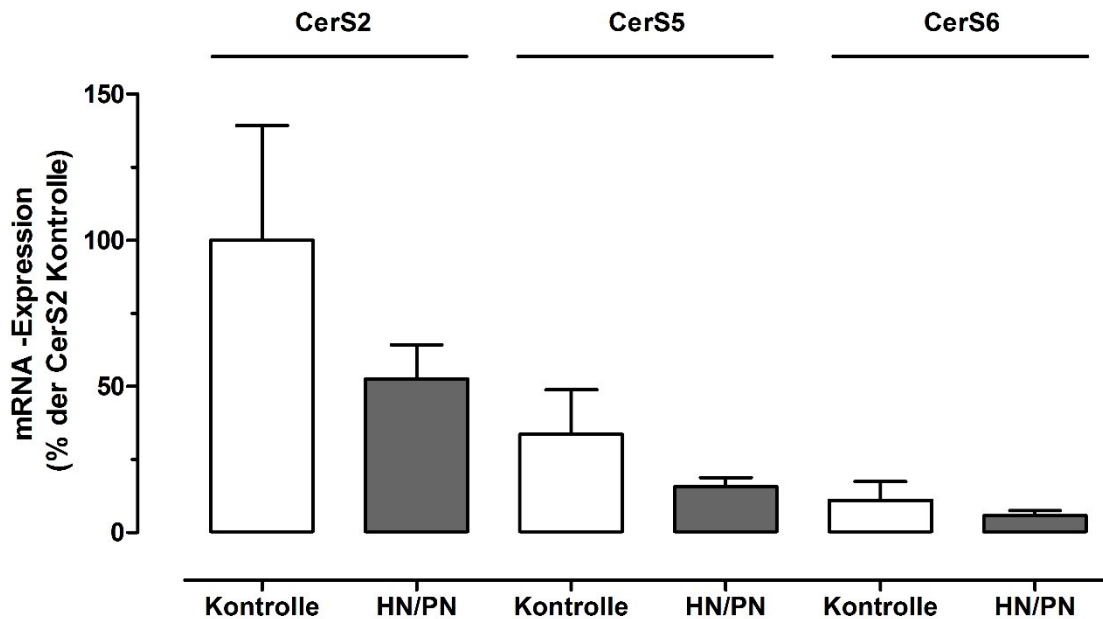
Im Hinblick auf Ceramid- und Dihydroceramidspiegel im Gewebe wurde im Nierenmark kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben aus den HN/PN-Patienten und den gesunden Kontrollen gemessen (Abbildung 29).



Ceramide (Cer)	Kontrolle	HN/PN	p-Wert
Cer d18:1/16:0	2,1 (1,7-4,1)	2,7 (1,9-3,4)	0,943
Cer d18:1/18:0	0,6 (0,5-1,0)	0,6 (0,5-0,9)	0,570
Cer d18:0/24:0	0,5 (0,5-0,6)	0,6 (0,5-0,6)	0,127
Cer d18:0/24:1	0,6 (0,4-0,7)	0,4 (0,4-0,5)	0,284

**Abbildung 29: Konzentration von Ceramiden bestimmter Kettenlänge im menschlichen Nierenmark.** In Biopsien aus dem Nierenmark von Patienten, die zum Zeitpunkt der Entnahme an Hydronephrose oder Pyelonephritis (HN/PN) litten und in tumorfreien Nierenmarkproben von Patienten, an denen eine Tumornephrektomie durchgeführt worden war (Kontrolle), wurden mittels LC-ESI-MS/MS, wie im Methodenteil beschrieben, Ceramide gemessen. Abgebildet sind die Interquartilsabstände sowie Median mit Minimum und Maximum in ng/mg Gewebe; n = 5 (Kontrolle), n = 9 (HN/PN).

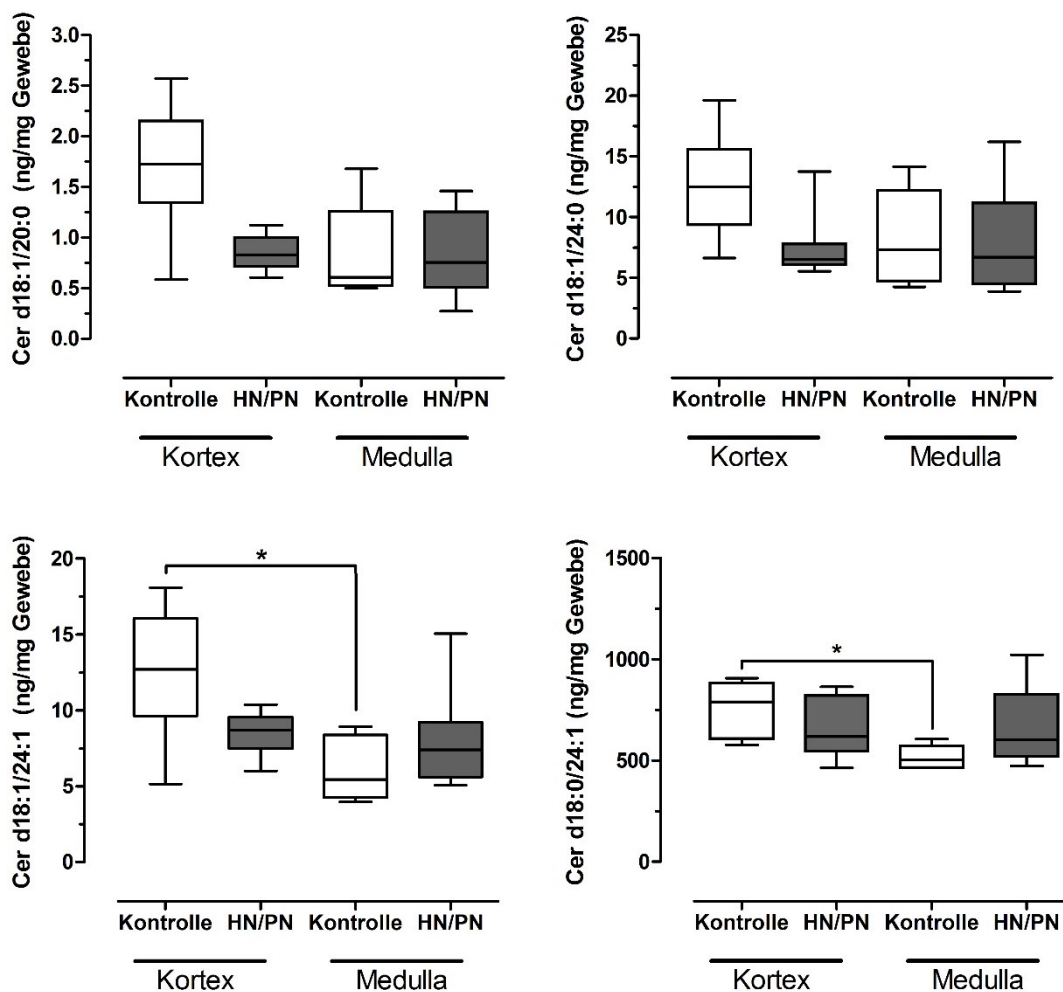
Es wurde als Nächstes die Genexpression der drei in den Nieren relevanten Ceramidsynthasen CerS2, CerS5 und CerS6 mittels Real-Time PCR gemessen (Abbildung 30). Wie auch im Nierenkortex wurde CerS2 am stärksten exprimiert, gefolgt von CerS5. Im Gegensatz zu den Proben aus dem Nierenkortex wurde im Nierenmark hingegen kein Anstieg, sondern eine Reduktion der Expression der Ceramidsynthasen gemessen.



**Abbildung 30: Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in den fibrotischen und gesunden Nierenmarkgewebeproben.** Es wurde die Expression von Ceramidsynthase 2 (CerS2), Ceramidsynthase 5 (CerS5) und Ceramidsynthase 6 (CerS6) gemessen. Die Expression in den Proben der HN/PN-Patienten wurde in Relation zu den Kontrollproben gesetzt und der Mittelwert mit  $\pm$  SEM abgebildet;  $n = 5$  (Kontrolle),  $n = 9$  (HN/PN).

### 3.2.3 Unterschiede der Konzentrationen von kettenlängenspezifischen Ceramiden zwischen Nierenrinde und Nierenmark in gesunden Biopsien

Die sehr langkettigen Ceramide Cer d18:1/24:0 und Cer d18:1/24:1 wiesen die höchsten Konzentrationen unter den hier gemessenen Ceramiden in allen Nierenbiopsien auf (Abbildung 31). Im gesunden Nierenkortex wurden Mittelwerte von 12,5 ng/mg und 12,6 ng/mg von Cer d18:1/24:0 bzw. Cer d18:1/24:1 bezogen auf das Gewicht der analysierten Gewebeproben bestimmt. Im gesunden Nierenmark wurden hingegen geringere Mittelwerte von lediglich 6,1 ng/mg und 8,2 ng/mg von Cer d18:1/24:0 bzw. Cer d18:1/24:1 berechnet, wobei der Unterschied zum Nierenkortex nur im Falle des Cer d18:1/24:1 statistisch signifikant war (p-Wert: 0,03). Die ermittelten Mittelwerte von Cer d18:1/20:0 von 1,7 ng/mg und 0,84 ng/mg in der Nierenrinde bzw. im Nierenmark wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (p-Wert: 0,052) auf.

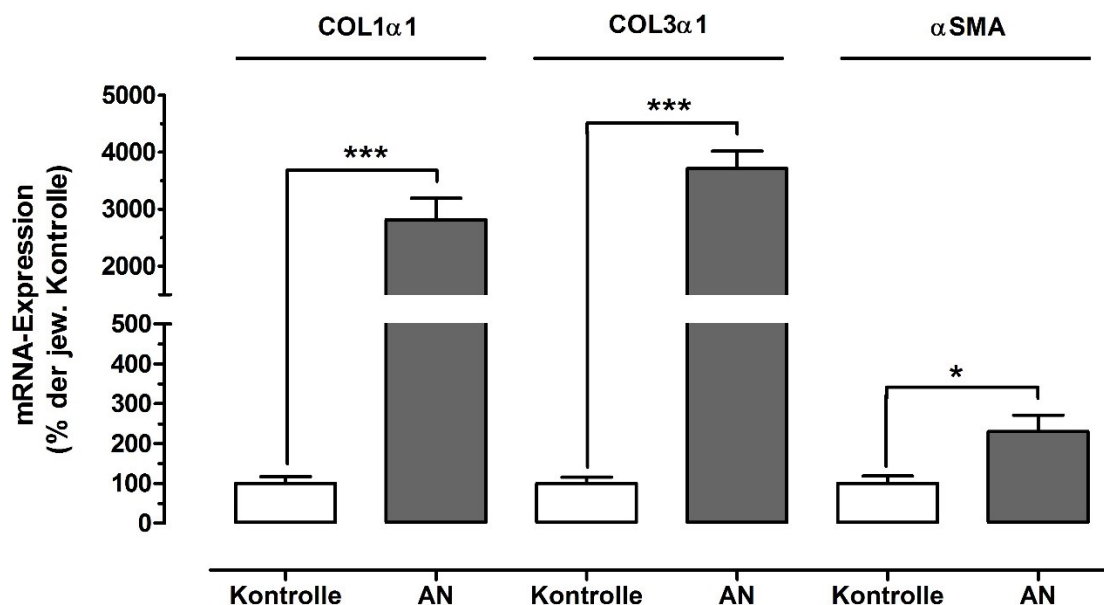


**Abbildung 31: Konzentration von Ceramiden bestimmter Kettenlänge im menschlichen Nierenkortex und in der Nierenrinde.** In Biopsien aus der Niere von Patienten, die zum Zeitpunkt der Entnahme an Hydronephrose oder Pyelonephritis (HN/PN) litten und in tumorfreien Nierenproben von Patienten, an denen eine Tumornephrektomie durchgeführt worden war (Kontrolle) wurden mittels LC-ESI-MS/MS, wie im Methodenteil beschrieben, Ceramide gemessen. Abgebildet sind die Interquartilsabstände sowie Median mit Minimum und Maximum in ng/mg Gewebe; \* $p < 0,05$ ; Kortex:  $n = 6$  (Kontrolle),  $n = 8$  (HN/PN), Medulla:  $n = 5$  (Kontrolle),  $n = 9$  (HN/PN).

Alle weiteren Werte der gemessenen Ceramide und Dihydroceramide sind in den Tabellen von Abbildung 25 und Abbildung 29 aufgeführt. Es wurden bei diesen Lipiden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben aus der gesunden Nierenrinde und dem gesunden Nierenmark gemessen.

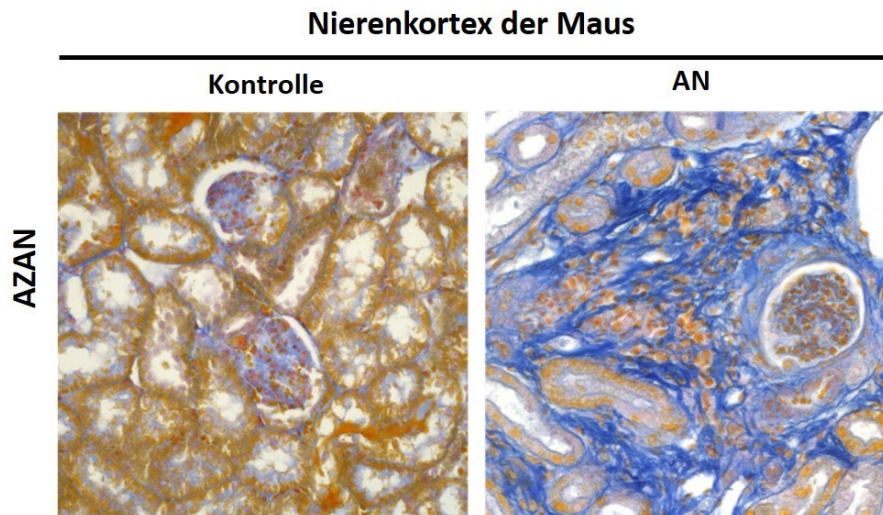
### 3.2.4 Veränderungen der Konzentrationen von kettenlängen-spezifischen Ceramiden in murinem Nierengewebe

Zum Vergleich der Befunde in den humanen Proben haben wir die Ceramidspiegel in Nierenhomogenisaten von Mäusen, die aufgrund einer 14-tägigen adeninreichen Diät an einer milden Nierenfibrose litten, sowie gesunden Kontrollmäusen gemessen (Abbildung 32). In Anlehnung an die Untersuchungen der humanen Proben haben wir auch in den Mausnieren die mRNA-Expression der Fibrosemarker COL1 $\alpha$ 1, COL3 $\alpha$ 1 und von  $\alpha$ SMA als Myofibroblastenmarker mittels Real-Time PCR gemessen.



**Abbildung 32: Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression von Fibrosemarkern in den fibrotischen und gesunden Kortextgewebeproben von Mäusen.** Es wurde die Expression von Kollagen Typ I, alpha 1 (COL1 $\alpha$ 1), Kollagen Typ III, alpha 1 (COL3 $\alpha$ 1), *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA) gemessen. Die Expression in den Proben der Mäuse aus dem AN-Modell wurde in Relation zu den Kontrollproben gesetzt und der Mittelwert  $\pm$  SEM in % abgebildet; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 9$  (Kontrolle),  $n = 5$  (AN).

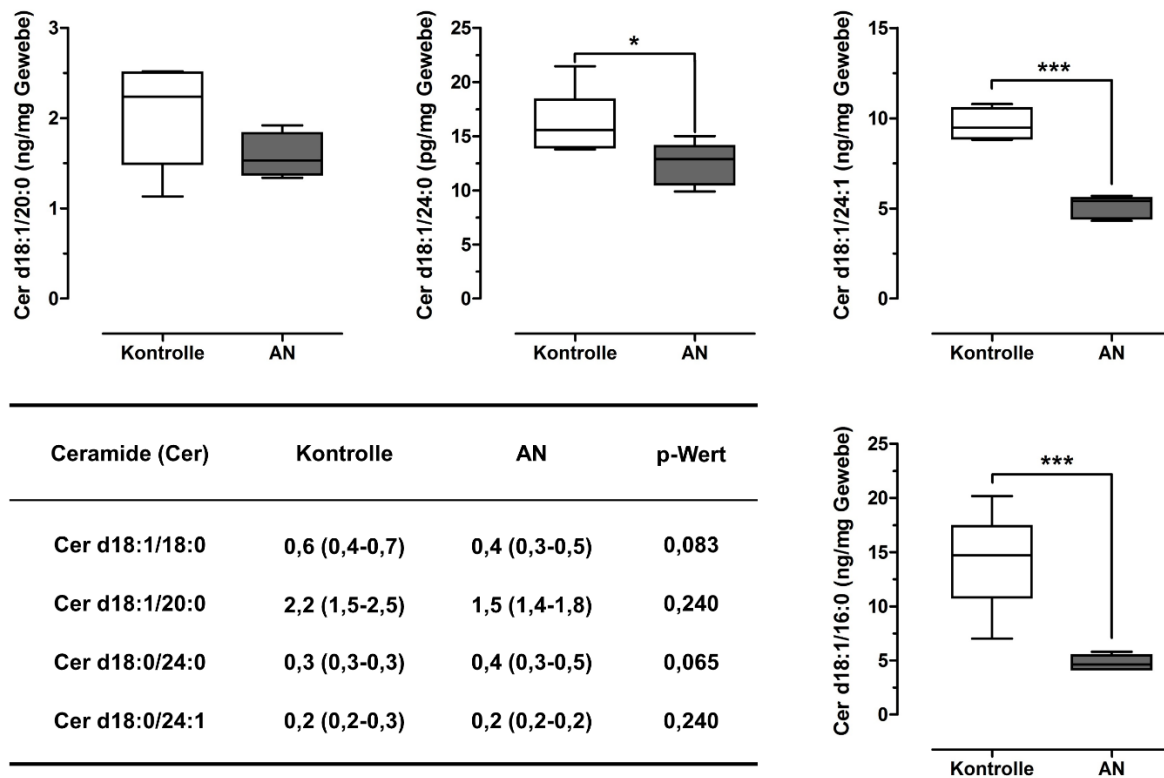
Mäuse mit einer AN wiesen eine ca. 30-fach höhere mRNA-Expression von COL1 $\alpha$ 1 und COL3 $\alpha$ 1 im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Die mRNA-Expression von  $\alpha$ SMA war ebenfalls signifikant höher in den kranken Tieren. Eine histologische Überprüfung der Fibrose in den Nieren erfolgte mittels einer AZAN-Färbung (Abbildung 33). Nur die Nieren der AN-Mäuse wiesen hierbei Areale mit starker Ausprägung der extrazellulären Matrix im Interstitium des Tubulussystems auf.



**Abbildung 33: Histochemische Färbungen von Nierenschnitten aus der Maus.** AZAN-Färbung, durchgeführt von Dr. Stefan Gauer (Klinik für Nephrologie, UKF), von Nierenschnitten aus Mäusen, die an einer Adenin-induzierten Nephropathie litten (AN) und von gesunden Kontrollmäusen (Kontrolle). Kollagenfasern, Bindegewebe erscheinen tiefblau, Mucine blau, Zellkerne orange und Zytoplasma sandfarben.

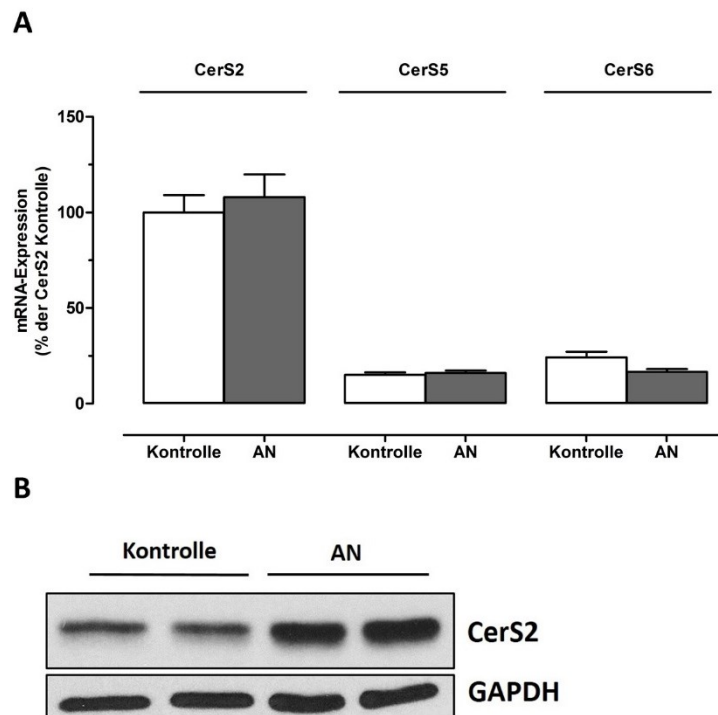
In den Nierenhomogenisaten der kranken Mäuse waren die Konzentrationen von den sehr langkettigen Ceramiden Cer d18:1/24:0 und Cer d18:1/24:1 signifikant niedriger im Vergleich zu denen aus den gesunden Mäusen (Abbildung 34). Der Median von Cer d18:1/24:0 war um 17% und der von Cer d18:1/24:1 war um 43% niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch das langkettige Ceramid Cer d18:1/16:0 war in den fibrotischen Nieren signifikant reduziert mit einem Median der Konzentration, der im Vergleich zur Kontrolle um 69% niedriger ausfiel. Die Konzentrationen von Cer d18:1/18:0 und Cer d18:1/20:0 und den Dihydroceramiden Cer d18:0/24:0 und Cer d18:0/24:1 waren hingegen nicht unterschiedlich.





**Abbildung 34: Konzentration von Ceramiden bestimmter Kettenlänge in Mausnieren.** In Homogenisaten aus der Niere von Mäusen, die an einer Adenin-induzierten Nephropathie litten (AN) und von gesunden Kontrollmäusen (Kontrolle) wurden mittels LC-ESI-MS/MS, wie im Methodenteil beschrieben, Ceramide gemessen. Abgebildet sind die Interquartilsabstände sowie Median mit Minimum und Maximum in ng/mg Gewebe; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 9$  (Kontrolle),  $n = 5$  (AN).

Die renale mRNA-Expression der Ceramidsynthasen CerS2, CerS5 und CerS6 wurde durch das Krankheitsmodell nicht verändert (Abbildung 35A). Die Proteinexpression von CerS2 wurde zudem mittels Western Blot untersucht, wodurch festgestellt werden konnte, dass CerS2 in den fibrotischen Proben stärker exprimiert wird (Abbildung 35B).



**Abbildung 35: Ergebnis der Real-Time PCR und des Western Blots zur Bestimmung der Expression der Ceramidsynthasen in den fibrotischen und gesunden Nierenproben. A:** Es wurde die Expression von Ceramidsynthase 2 (CerS2), Ceramidsynthase 5 (CerS5) und Ceramidsynthase 6 (CerS6) gemessen. Die Expression in den Proben der Mäuse mit AN wurde in Relation zu der Expression in den Proben der Mäuse aus der Kontrollgruppe gesetzt und der Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet;  $n = 9$  (Kontrolle),  $n = 5$  (AN). **B:** Repräsentativer Western Blot zur Detektion der Proteinexpression von CerS2 (Bande bei ca. 38 kDa) und GAPDH als Referenzprotein.

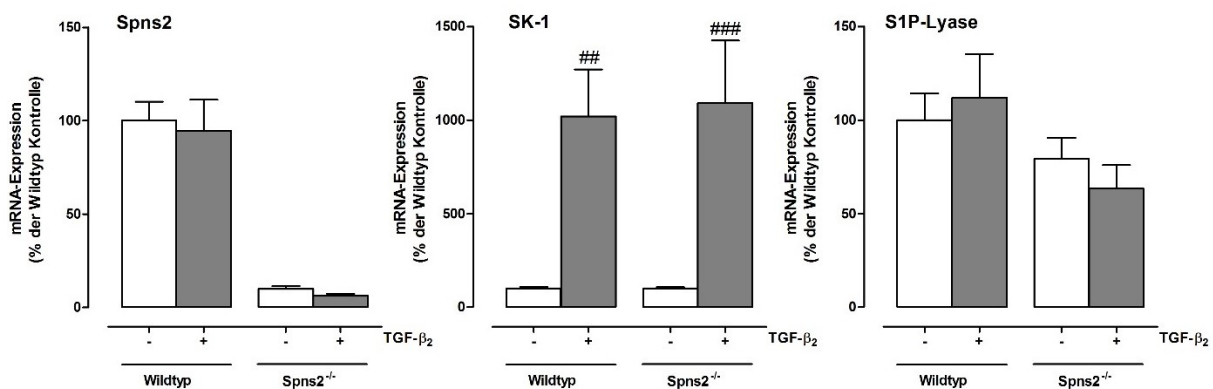
### 3.3 Die Rolle des Sphingosin-1-Phosphat-Transporters Spns2 im Kontext der Nierenfibrose

In verschiedenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass es Unterschiede zwischen der intra- und extrazellulären Wirkung von S1P gibt. Intrazellulär hemmt S1P die CTGF-Expression in renalen Zellen (Ren *et al.* 2009; Blanchard *et al.* 2018). Über eine Aktivierung der S1P-Rezeptoren hingegen fördert extrazelluläres S1P die Bildung von profibrotischem CTGF (Xin *et al.* 2004). Da S1P im Zytosol gebildet wird, ist ein aktiver Transport über die Plasmamembran zur Aktivierung der extrazellulären S1P-Rezeptoren notwendig. Neben dem möglichen Einfluss verschiedener ABC-Transporter ist aus der Literatur bekannt, dass insbesondere Spns2 eine zentrale Rolle

für den Transport und somit für die Lokalisation von S1P spielt (Mitra *et al.* 2006; Hisano *et al.* 2012; Liu *et al.* 2016).

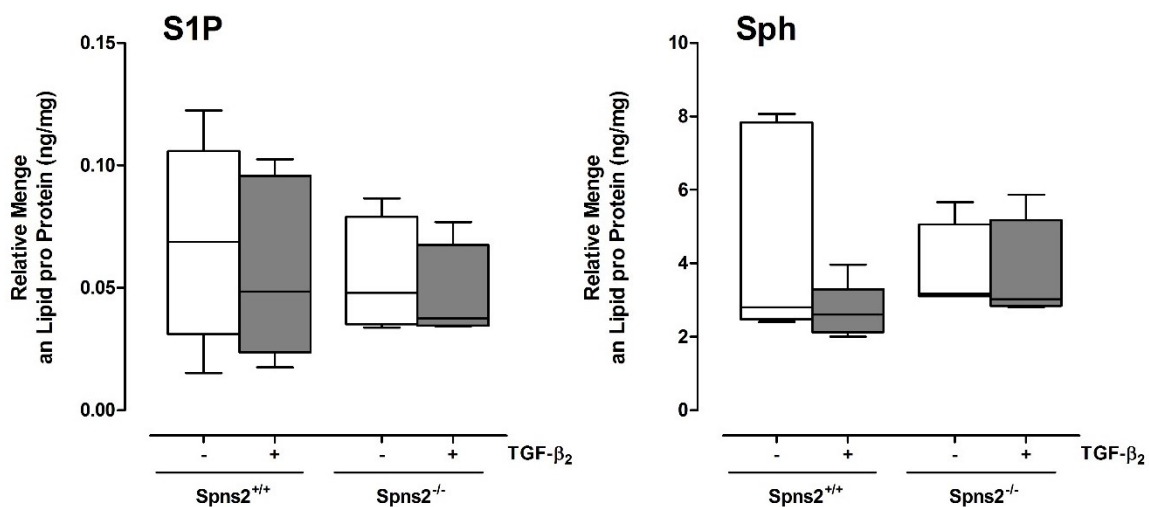
### 3.3.1 Die Genexpression der SK-1 und S1P-Lyase ist unverändert in Spns2<sup>-/-</sup>-Zellen im Vergleich zu Spns2<sup>+/+</sup>-Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob der Knockout von Spns2 zu Veränderungen der Genexpression wichtiger Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels unter fibrotischen Bedingungen führt. Die Expression der SK-1 wurde in Spns2<sup>-/-</sup>-Zellen durch TFG-β<sub>2</sub> genauso stark induziert wie in den Spns2<sup>+/+</sup>-Zellen (Abbildung 36). Die Genexpression der S1P-Lyase war ebenfalls in beiden Genotypen, unabhängig von der Stimulation mit TFG-β<sub>2</sub>, nicht signifikant verändert. Die Expression von Spns2 war nach 16 Stunden Stimulation mit TFG-β<sub>2</sub> in den Spns2<sup>+/+</sup>-Zellen unverändert im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Spns2<sup>-/-</sup>-Zellen zeigten wie erwartet nur ein schwaches Hintergrundsignal in der RT-qPCR mit der Spns2-Sonde.



**Abbildung 36: Genexpression von SK-1, Spns2 und S1P-Lyase in Mesangiumzellen der Maus.** Die Zellen wurden für 16 h mit 5 ng/ml TFG-β<sub>2</sub> stimuliert. Mittels RT-qPCR wurden die mRNA-Level von SK-1, Spns2 und S1P-Lyase in Spns2<sup>-/-</sup>- und Spns2<sup>+/+</sup>-mMC gemessen und ausgewertet. Abgebildet sind die Mittelwerte in Prozent der berechneten Konzentrationen ± SEM; <sup>##</sup>p < 0,01; <sup>###</sup>p < 0,001 verglichen mit der unbehandelten Kontrolle; n = 10-12 aus 3 unabhängigen Versuchen.

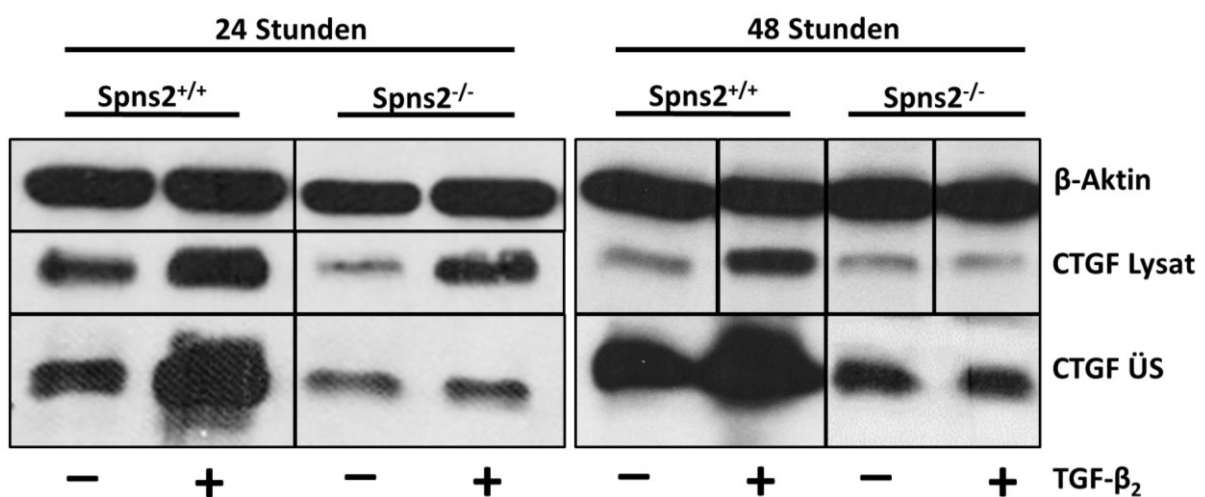
In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob das Fehlen des S1P-Transporters Spns2 nach einer Stimulation mit TGF- $\beta_2$  zu einer Akkumulation von S1P in der Zelle führt. Die Auswertung der Ergebnisse aus den LC-ESI-MS/MS-Messungen zeigt, dass S1P in Spns2<sup>-/-</sup>-Zellen im Vergleich zu Spns2<sup>+/+</sup>-Zellen nicht akkumuliert. Die relativen Mengen an Sphingosin pro Protein waren ebenfalls nicht unterschiedlich. Im Zellkulturüberstand konnte S1P nicht nachgewiesen werden, da die Konzentrationen unter dem Detektionslimit der LC-ESI-MS/MS-Messung lagen.



**Abbildung 37: S1P und Sphingosinkonzentration in Mesangiumzellen der Maus.** Mit Hilfe von Massenspektrometrie wurden die Konzentrationen der Sphingolipide in den Zellpellets ermittelt. Als Referenz wurde die Proteinmenge in Zelllysaten aus dem gleichen Versuch per Bradford bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Box-Plots nach Tukey. Spns2<sup>+/+</sup>: n = 6; Spns2<sup>-/-</sup>: n = 4.

### 3.3.2 Spns2<sup>-/-</sup>-Zellen bilden weniger CTGF nach Stimulation mit TFG-β<sub>2</sub>

Ob sich das Fehlen des S1P-Transporters Spns2 auf die TFG-β<sub>2</sub>-induzierte CTGF-Expression auswirkt, wurde in Mesangiumzellen aus den Nieren von Spns2<sup>-/-</sup>- und Spns2<sup>+/+</sup>-Mäusen der Linie Swiss Webster untersucht. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 5 ng/ml TFG-β<sub>2</sub> stimuliert und die Proteinexpression von CTGF nach 24 und 48 Stunden sowohl im Zellkulturüberstand als auch in den Zelllysaten per Western Blot analysiert (Abbildung 38). Die CTGF-Expression stieg durch die Stimulation mit TFG-β<sub>2</sub> an und war sowohl in den Zelllysaten (CTGF Lysat) als auch im Zellkulturüberstand (CTGF ÜS) nachweisbar. Die gebildete Menge an CTGF war im Zelllysate und Zellkulturüberstand der Spns2<sup>+/+</sup>-mMC sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden stets höher im Vergleich zu den Spns2<sup>-/-</sup>-mMC.



**Abbildung 38: CTGF-Expression in Mesangiumzellen der Maus.** Ruhende Mesangiumzellen aus Spns2<sup>-/-</sup>- und Spns2<sup>+/+</sup>-Mäusen wurden für die angegebenen Zeiten mit 5 ng/ml TFG-β<sub>2</sub> stimuliert. Die Expressionen von CTGF und des Haushaltgens β-Aktin wurden mittels Western Blot nachgewiesen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchung der Rolle des Sphingosin-1-Phosphat Rezeptors 5 (S1P<sub>5</sub>) in fibrotischen Nierenerkrankungen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell zur tubulointerstitiellen Fibrose angewendet, um eine mögliche Rolle von S1P<sub>5</sub> in Nierenerkrankungen zu untersuchen, da S1P<sub>5</sub> bereits *in vitro* eine profibrotische Wirkung in humanen Mesangiumzellen zeigte (Wünsche *et al.* 2015). Zudem konnten mehrere Studien durch die Verwendung von funktionellen S1P-Rezeptorantagonisten und auch mittels S1P<sub>3</sub>-defizienten Mäusen einen schützenden Effekt in fibrotischen Nierenmodellen erreichen. So zeigte beispielsweise die Verwendung von Fingolimod, welches an alle S1P-Rezeptoren außer S1P<sub>2</sub> bindet, bei der Thy1.1-induzierten mesangioproliferativen Glomerulonephritis, bei Antikörper-induzierter membranöser Glomerulonephritis, bei Adriamycin-induzierter Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose, bei Albuminüberschuss-induzierter als auch bei 5/6-Nephrektomie-induzierter tubulointerstitieller Fibrose und bei Streptozotizin-induzierter DN bei Ratten einen milderen Krankheitsverlauf (Peters *et al.* 2004; Martini *et al.* 2007; Awad *et al.* 2011; Sui *et al.* 2012; Ni *et al.* 2013; Xu *et al.* 2014; Yazdani *et al.* 2015). Doch auch in Mausmodellen zur Untersuchungen von tubulointerstitiellen Fibrose hervorgerufen durch UUO und auch bei akutem Nierenschaden, induziert durch einen Ischämie-Reperfusionsschaden oder Cisplatin, konnte ein geringerer Nierenschaden durch die Behandlung mit Fingolimod erreicht werden (Bajwa *et al.* 2010; Shobha *et al.* 2014; Bajwa *et al.* 2015).

Als Nächstes wurden Entzündungsgeschehen im Gewebe untersucht und festgestellt, dass die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen in den Nieren aus den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen im AN-Modell signifikant geringer war als in den Wildtypmäusen. Da diese Zytokine von infiltrierten oder lokal proliferierten Immunzellen gebildet werden können, wurden die Nieren auf mononukleäre Phagozyten, ein Sammelbegriff für Makrophagen und dendritische Zellen, untersucht (Gottschalk und Kurts 2015). Es wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass mononukleäre Phagozyten in großer Zahl in entzündeten Nieren auftreten und ihnen eine wichtige Rolle für den Krankheitsverlauf zukommt (Yang *et al.* 1998; Eardley *et al.* 2006; Duffield 2010; Weisheit *et al.* 2015; Klessens *et al.* 2017). Zusätzlich wurde beobachtet, dass S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>

-Mäusen periphere Ly6C<sup>-</sup>-Monozyten fehlen, welche Vorgänger von bestimmten Populationen geweberesidenter Makrophagen sein können (Geissmann *et al.* 2003; Debien *et al.* 2013). Die proinflammatorischen Ly6C<sup>+</sup>-Monozyten hingegen exprimieren kein S1P<sub>5</sub> (Debien *et al.* 2013). Im Gewebe von nierenkranken Wildtypmäusen und S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen wurde eine große Anzahl von F4/80<sup>+</sup>-Zellen gefunden. F4/80 ist ein vielfach verwendeter Marker für mononukleäre Phagozyten (Cao *et al.* 2015; Gottschalk und Kurts 2015; Anjos Cassado *et al.* 2017). Mit Hilfe eines Antikörper-basierten Nachweises wurde ein signifikanter Anstieg von F4/80<sup>+</sup>-Zellen nach 14 Tagen im AN-Modell bei S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen, jedoch nicht bei Wildtypmäusen, festgestellt, was vermutlich durch die geringe Probenzahl bedingt war. Auf mRNA-Ebene wurde hingegen ein 6-facher Anstieg von *Adgre1*, dem Gen von F4/80, nach 14 Tagen im AN-Modell sowohl bei S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen als auch bei Wildtypmäusen gemessen.

Obwohl die Anzahl der Immunzellen in den kranken Geweben der S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse nicht niedriger war als in den Wildtypen, wurden jedoch signifikant geringere mRNA-Mengen von proentzündlichen Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) gemessen. Diese Zytokine können unter anderem von Makrophagen in Reaktion auf entzündliche Prozesse sezerniert werden (Arango Duque und Descoteaux 2014). Hinzu kommt, dass auch die mRNA-Mengen von *Mcp-1* (*Ccl2*), ein Chemokin, das Monozyten anlockt, signifikant niedriger in den Nieren von S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber Wildtypen waren (Leonard und Yoshimura 1990). Die mengenmäßigen Unterschiede von Zytokinen zwischen S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypmäusen könnte durch geringe Aktivierung von Immunzellen oder auch durch Zellen des tubulären Systems bedingt sein, welche ebenfalls in der Lage sind, proentzündliche Zytokine freizusetzen (Daha und van Kooten 2000). So wurde bereits in einer Studie gezeigt, dass die Verwendung des S1P<sub>1</sub>-spezifischen Agonisten SEW2871 zu einer Verringerung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Mausmodell der DN führte, obwohl die Anzahl der Lymphozyten in der Niere genauso hoch war, wie in den unbehandelten diabetischen Mäusen (Awad *et al.* 2011).

Über die Rolle von S1P<sub>5</sub> in (differenzierten) Monozyten ist bisher kaum etwas bekannt, doch konnte seine Expression auf einigen Subtypen nachgewiesen werden (Duong *et al.* 2004; Debien *et al.* 2013; Barnawi *et al.* 2015). Es wurde berichtet, dass eine

Antagonisierung von S1P<sub>5</sub> durch Suramin, ein Antiprotozoikum, das zur Behandlung der Schlafkrankheit eingesetzt wird, die Phagozytose von alveolaren Makrophagen verbessert werden konnte (Barnawi *et al.* 2015). Übertragen auf unser Modell könnte das Fehlen von S1P<sub>5</sub> die Aktivierung des Inflammasoms, ausgelöst durch Phagozytose von Kristallen im Nierengewebe, unterbunden haben, weshalb die Entzündungsreaktion schwächer ausfiel (Kim *et al.* 2015). Die mRNA-Expression von NLRP3, einer Komponente des Inflammasoms, war genauso hoch in den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen wie in den Wildtypmäusen, weshalb die Aktivierung des Inflammasoms daraufhin anhand der Sekretion von IL-1 $\beta$  untersucht wurde (Rajamäki *et al.* 2010). Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  war mehr als doppelt so hoch in Wildtypmäusen nach 14 Tagen im AN-Modell im Vergleich zu den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen. Dass eine pharmakologische Inhibierung der Aktivierung von NLRP3 in Mäusen oder die Verwendung von NLRP3<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer milderer Ausprägung der Fibrose im AN-Modell führt, wurde bereits gezeigt (Ludwig-Portugall *et al.* 2016).

Dass S1P eine wichtige Rolle für die Infiltration von Immunzellen in das Gewebe spielt, wurde bereits intensiv erforscht und es wurde eine immunsupprimierende Wirkung der Blockade der S1P-Rezeptoren festgestellt (Brinkmann *et al.* 2004; Lai *et al.* 2007; Chun und Hartung 2010; Imeri *et al.* 2015; Glaenzel *et al.* 2018). Bis heute sind bereits zwei Medikamente, Fingolimod und Siponimod für die Behandlung der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose auf dem Markt (Sharma *et al.* 2011; Al-Salama 2019). Obwohl die immunsupprimierende Wirkung hauptsächlich der Internalisierung und dem Abbau von S1P<sub>1</sub> zugeschrieben wird, ist es interessant zu beobachten, dass beide Medikamente auch S1P<sub>5</sub> antagonisieren (Brinkmann *et al.* 2004; Lai *et al.* 2007; Allende *et al.* 2010). Eine verminderte Infiltrierung des Nierengewebes durch Immunzellen konnten wir in den Nierengeweben der S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse nicht feststellen, was zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen aus der Literatur passt, wonach S1P<sub>1</sub> für die chemotaktische Wirkung von S1P verantwortlich ist. Zudem wurde auch kein signifikanter Unterschied in der Genexpression der anderen S1P-Rezeptoren zwischen den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen und den Wildtypmäusen festgestellt.



Es wurde herausgefunden, dass S1P<sub>5</sub> sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine entscheidende Rolle für die Wanderung der natürlichen Killerzellen einnimmt (Walzer *et al.* 2007; Mayol *et al.* 2011; Drouillard *et al.* 2018). In dem von uns verwendeten Tiermodell wurde jedoch keine Infiltration von natürlichen Killerzellen sowohl in Nierengewebe von Wildtypen als auch aus S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt. Auch die Ergebnisse zu mRNA-Spiegeln von Oberflächenmarkern anderer Immunzellen zeigten in dem AN-Modell keine Unterschiede zwischen Wildtypen und S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen.

Im Plasma der kranken Wildtypmäuse haben wir geringere Konzentrationen von S1P und Sphingosin im Vergleich zu den gesunden Kontrollen gemessen. Dieser Abfall war in den kranken S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen nicht zu beobachten. Die mRNA-Expression der SK-1 war hingegen in Mäusen beider Genotypen durch das AN-Modell in den Nieren stark erhöht und es konnte auch eine Analyse von anderen Enzymen des Sphingolipidstoffwechsels kein Befund erhoben werden, der diesen Unterschied erklären könnte. Geringere S1P-Konzentrationen im Plasma wurden aber auch bei Patienten mit Makroalbuminurie gegenüber Patienten mit normaler Nierenfunktion gemessen (Bekpinar *et al.* 2015). Bei Kindern, die unter chronischer Niereninsuffizienz litten, wurden hingegen höhere S1P-Spiegel gemessen (Benito *et al.* 2018).

Die Expression verschiedener Fibrosemarker war in den Nieren der S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse im AN-Modell signifikant niedriger gegenüber den Wildtypen. Ein Grund für die unterschiedliche Expression von profibrotischen Genen könnte der unterschiedliche Gewebeschaden in den Nieren sein, der in den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen milder ausfiel als in den Wildtypen. Doch in humanen Mesangiumzellen ist S1P<sub>5</sub> notwendig für eine TGF-β<sub>2</sub>-induzierte CTGF-Expression, was auch in den Mäusenieren der Grund für die mildere Fibrose sein könnte (Wünsche *et al.* 2015). Welche Zellen in der Niere für die antifibrotische Wirkung von S1P<sub>5</sub> verantwortlich waren, konnte hier jedoch nicht abschließend geklärt werden, da S1P<sub>5</sub> auf mRNA-Ebene nur in geringen Mengen in der Niere exprimiert wurde und keine verlässlichen Antikörper für eine Detektion mittels Western Blot zur Verfügung standen.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass eine Herunterregulation von S1P<sub>5</sub> die Migration und Proliferation einer Tumorzelllinie aus dem Kolon über die Inhibierung von NF-κB reduzierte (Zhou *et al.* 2020). Dass die Inhibierung von NF-κB zur Linderung

von Entzündungen und Fibrose in der Niere führt, wurde bereits in mehreren Studien gezeigt (Tashiro *et al.* 2003; Esteban *et al.* 2004; Panzer *et al.* 2009; Wang *et al.* 2015). Mit Hilfe eines Mausmodells konnte die Gruppe um Zhou zudem belegen, dass die Herunterregulation von S1P<sub>5</sub> die Tumorgröße reduziert und eine Hochregulation von S1P<sub>5</sub> das Tumorwachstum fördert (Zhou *et al.* 2020). In diesem Zusammenhang wäre es daher interessant, auch die Rolle von NF-κB in dem AN-Modell mit S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen zu untersuchen.

Diese neuen Ergebnisse zeigen, dass S1P<sub>5</sub> ein interessanter Rezeptor ist, der weiter erforscht werden muss. Die Inhibierung des S1P<sub>5</sub>-Signalwegs scheint ein vielversprechendes Ziel für die Behandlung von Entzündungen und Fibrose in der Niere zu sein. Besonders greifbar wird diese Vision dadurch, dass mit Siponimod bereits ein S1P<sub>5</sub>-Antagonist auf dem Markt ist. Mit dem von AbbVie entwickelten S1P<sub>5</sub>-spezifischen Antagonisten A-971432 können hierzu spezifische Studien durchgeführt werden (Di Pardo *et al.* 2018).

## **4.2 Untersuchung der Veränderungen von kettenlängenspezifischen Ceramiden in fibrotischen Nieren**

Veränderungen in den Konzentrationen von bestimmten Ceramiden wurden bereits bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten beobachtet. Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit von geeigneten Gewebeproben wurde in den meisten Studien lediglich die Veränderungen im Plasma und Serum analysiert (Cutler *et al.* 2004; Haus *et al.* 2009; Kajander *et al.* 2009; Brodlie *et al.* 2010; Brunkhorst *et al.* 2015; Patyna *et al.* 2019).

Eine Studie, die den Zusammenhang zwischen Ceramiden im Plasma und dem Risiko für Herzversagen untersuchte, zeigte eine positive Korrelation von langkettigen Ceramiden, aber eine negative Korrelation von sehr langkettigen Ceramiden mit dem Risiko von Herzversagen (Lemaitre *et al.* 2019). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Unterbindung der Synthese von sehr langkettigen Ceramiden durch Genknockout der Serin-Palmitoyl-Transferase 2 zu kardialen Dysfunktionen führte (Lee *et al.* 2012).

Eine Studie zu cystischer Fibrose veranschaulichte, welche Veränderungen in den Konzentrationen der Ceramide im Plasma von Patienten gegenüber gesunden Probanden stattfinden und welche Rolle die Ceramide in einem Mausmodell für cystische Fibrose spielen (Guilbault *et al.* 2008). Patienten, die an cystischer Fibrose litten, hatten signifikant niedrigere Konzentrationen von sehr langkettigen Ceramiden im Plasma. Zusätzlich konnte die Gruppe zeigen, dass *Cftr*<sup>-/-</sup>-Mäuse (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*), die für das Mausmodell einer cystischen Fibrose eingesetzt wurden, ebenfalls geringere Konzentrationen an Ceramiden als Wildtypen aufwiesen und auch schon vor einer Infektion eine höhere Immunzellinfiltration und Fibrose zeigten. Wurden die Mäuse mit *Pseudomonas* infiziert und zusätzlich mit Fenritinid, ein Retinoidderivat zur Behandlung von Tumoren und cystischer Fibrose, das zur Akkumulation von Ceramiden im Gewebe führt, behandelt, konnte die Anzahl der Bakterien in den *Cftr*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf das Niveau in den Wildtypen reduziert werden (Wu *et al.* 2001; Guilbault *et al.* 2008). Eine weitere Studie belegte, dass *Cftr*<sup>-/-</sup>-Mäuse weniger sehr langkettige Ceramide aber mehr langkettige Ceramide in der Lunge und im Plasma akkumulieren (Garić *et al.* 2017). *CerS2*<sup>-/-</sup>-Mäuse, welche ebenfalls weniger der sehr langkettigen Ceramide Cer d18:1/24:0 und Cer d18:1/24:1 und dafür mehr des langkettigen Ceramids Cer d18:1/16:0 aufwiesen, hatten entzündete und vergrößerte Lungen (Petrache *et al.* 2013).

In Colitis ulcerosa-Patienten wurden ebenfalls Veränderungen von bestimmten Sphingolipiden im Darmgewebe festgestellt, die mit einer verminderten *de novo* Synthese, bedingt durch posttranslationale Modifikationen der Serin-Palmitoyl-Transferase und Ceramidsynthesen, begründet wurden (Bazarganipour *et al.* 2019). So waren in den Patientenproben, die sehr langkettigen Dihydroceramide signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrollgeweben.

In einigen der Studien wurde ein Anstieg von langkettigen und sehr langkettigen Ceramiden im Plasma von Patienten gemessen, die an Nierenerkrankungen wie LN oder DN litten (Haus *et al.* 2009; Galadari *et al.* 2013; Mitsnefes *et al.* 2014; Checa *et al.* 2017; Patyna *et al.* 2019). So konnten wir bereits zeigen, dass Cer d18:1/24:1 im Plasma und Serum von Patienten mit LN signifikant erhöht war, sowohl im Vergleich zu gesunden Kontrollen als auch im Vergleich zu Patienten, die an SLE ohne Nierenbeteiligung litten (Patyna *et al.* 2019).

Eine altersbedingt veränderte Ceramidkonzentration demonstrierte eine andere Studie und fand erhöhte Konzentrationen von Cer d18:1/24:1 im Serum von 75-90 Jahre alten Frauen gegenüber 24-40 Jahre alten Frauen, sowie im Serum von alten gegenüber jungen Affen (Khayrullin *et al.* 2019). Jedoch ist bekannt, dass die Nierenfunktion mit dem Alter stetig abnimmt (Shlipak *et al.* 2009; Denic *et al.* 2016).

Es stellt sich dennoch die Frage, ob Ceramide als Biomarker für bestimmte Krankheiten geeignet sind. Da offensichtlich verschiedene Erkrankungen in unterschiedlichen Organen eine Veränderung von Ceramiden im Plasma und Serum hervorrufen können, erscheint eine eindeutige Zuordnung ausschließlich anhand der Analyse von Ceramiden im Plasma unrealistisch. Jedoch könnte das Ceramidprofil im Plasma eines Patienten mit bisherigen Daten verglichen und dadurch weitere spezifische diagnostische Verfahren durchgeführt werden. Über die genaue Funktion und Ursachen für die Veränderungen von bestimmten Ceramiden im Blut und den Geweben ist bisher wenig bekannt, weshalb Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit vorliegen, wichtig sind, um die Zusammenhänge zu entschlüsseln. Im Gegensatz zu dem bioaktiven Lipidmediator S1P, welcher von Erythrozyten und Thrombozyten aktiv über spezifische Transporter sezerniert werden kann, gelangen Ceramide wohl hauptsächlich durch extrazelluläre Vesikel wie Exosomen ins Blut (Hänel *et al.* 2007; Vu *et al.* 2017; Khayrullin *et al.* 2019). Aus diesem Grund ist es notwendig, die Veränderungen von Ceramiden in erkrankten Geweben zu untersuchen, um den Wissensstand von Korrelationen hin zu Kausalitäten voranzubringen. Somit können auch Mechanismen identifiziert werden, die als Ziele für pharmakologische Modulationen zur Verbesserung des Krankheitsbildes genutzt werden können.

Veränderungen der Sphingolipide im Nierengewebe von Patienten mit Nierenerkrankungen waren bisher jedoch kaum Gegenstand der Forschung. Deshalb wurde in dieser Studie untersucht, ob sich die Ceramidspiegel im Nierengewebe in Gegenwart einer Fibrose, dem wichtigen Kennzeichen nahezu aller chronischen Nierenerkrankungen, im Vergleich zu gesunden Kontrollen verändern.

Tatsächlich wurden Unterschiede bei bestimmten Ceramiden zwischen gesundem und fibrotischem Nierengewebe von Patienten gefunden. Diese Effekte konnten auch in zwei Mausmodellen, wie dem hier beschriebenen Modell zur AN und im Modell der UUO, welche von den Kolleginnen Dr. Stephanie Schwalm und Dr. Sandra Beyer durchgeführt wurden, reproduziert werden. Die Konzentrationsspiegel der sehr langkettigen Ceramide Cer d18:1/24:0 und Cer d18:1/24:1 waren signifikant niedriger im fibrotischen Nierenkortex der Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollgeweben. Andere Ceramidspezies, wie die langkettigen Ceramide und sehr langkettigen Dihydroceramide, waren hingegen nicht in ihrer Konzentration im fibrotischen Nierenkortex gegenüber dem gesunden Gewebe verändert. Die spezifische Reduktion der sehr langkettigen Ceramide wurde ebenfalls im entzündeten und fibrotischem Nierengewebe der Mäuse, die an einer AN litten, nachgewiesen. Dies spricht dafür, dass es sich nicht um eine allgemeine Reduktion aller Ceramide im Gewebe handelt.

Die Ursache für diese konsistenten Veränderungen der Ceramide im Nierengewebe aus Menschen und Mäusen kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Ein Einfluss des Alters auf die Ceramidkonzentrationen scheint zumindest ausgeschlossen. So haben Eum *et al.* (2020) keine Unterschiede in den Ceramidspiegeln im Nierengewebe von 4 und 25 Monate alten Mäusen festgestellt. Interessant wäre zudem auch, die Zusammensetzung der Sphingomyeline in Bezug auf kettenlängenspezifische Unterschiede zu messen, denn Ceramide werden auch aus der Spaltung von Sphingomyelin mittels Sphingomyelinasen gebildet, wodurch ein Einfluss denkbar ist.

Unter den vielen Enzymen des Sphingolipidstoffwechsels wurde eine Substratspezifität bezüglich unterschiedlicher Kettenlänge der Fettsäurereste bisher jedoch nur bei den Ceramidsynthasen bestätigt (Levy und Futerman 2010b). Die sechs verschiedenen Ceramidsynthasen der Säugetiere sind unterschiedlich stark exprimiert in den verschiedenen Geweben. In den Nieren der Mäuse wird vor allem die CerS2 und in geringeren Mengen noch CerS5 und CerS6 exprimiert (Laviad *et al.* 2008). Diese Befunde konnten wir durch Messung von 5- bis 6-fach höheren mRNA-Spiegeln von CerS2 gegenüber CerS5 und CerS6 bestätigen, welche die Synthese von Cer d18:1/16:0 katalysieren (Levy und Futerman 2010b). Die CerS2 bevorzugt für die Katalyse sehr langkettige Acyl-CoA-Moleküle zur Bildung von Cer d18:1/22:0 bis hin zu

Cer d18:1/26:0 (Laviad *et al.* 2008; Pewzner-Jung *et al.* 2010). Menschliche Nieren zeigen ein ähnliches Expressionsmuster mit CerS2 als die am stärksten exprimierte Ceramidsynthase und geringer Expression von CerS4-6 (Uhlén *et al.* 2015). In unserer Studie konnten wir auf mRNA-Ebene keine Unterschiede in der Expression von CerS2, CerS5 und CerS6 in den Nierengeweben aus den erkrankten im Vergleich zu den gesunden Mäusen messen. Die mRNA-Expression spiegelt jedoch nicht die Translation und Aktivität der Ceramidsynthasen wider, welche durch Dimerisierung, Bindung von S1P, BAK oder miRNAs beeinflusst werden kann (Siskind *et al.* 2010; Matanes *et al.* 2019). So wurde gezeigt, dass die Aktivität von CerS2 von der Bildung von Heterodimeren mit CerS4, CerS5 oder CerS6 abhängt (Laviad *et al.* 2012). Zudem ist CerS2 die einzige Ceramidsynthase, bei der eine Bindestelle für S1P nachgewiesen worden ist, welche zur Inhibierung des Enzyms führt (Laviad *et al.* 2008). Deshalb ist es möglich, dass die beobachteten Unterschiede in den Ceramiden auf die Ceramidsynthasen zurückzuführen sind, obwohl sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression der CerS2 in den AN Mäusen nicht geringer war im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Die zugehörigen sehr langkettigen Dihydroceramide, welche ebenfalls durch die Ceramidsynthasen gebildet werden, wiesen keinen Unterschied zwischen den kranken und den gesunden Nierenbiopsien auf. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Dihydroceramide in deutlich geringerer Konzentration als die sehr langkettigen Ceramide in der Niere vorliegen und sie lediglich im ER als Zwischenschritt zur Ceramidsynthese aus Sphinganin und Acyl-CoA entstehen (Rother *et al.* 1992). Die Ceramide hingegen sind zudem noch im Golgi-Apparat, in der Plasmamembran, insbesondere in ceramidreichen Plattformen, und in Lysosomen zu finden und können neben der *de novo*-Synthese im ER aus den Dihydroceramiden auch noch über die Ceramidsynthasen aus Sphingosin und Acyl-CoA oder aus der Spaltung von Sphingomyelin gebildet werden (Grösch *et al.* 2012). Somit können die Veränderungen in den Ceramiden durch unterschiedliche Enzyme in verschiedenen Organellen bedingt sein.

Besonders interessant für diese Studie ist, dass langkettige Ceramide (C12-C18) generell als proapoptotisch angesehen werden, während sehr langkettige Ceramide (C20-C26) Apoptose verhindern können (Grösch *et al.* 2012). Da Apoptose ein stets auftretendes Phänomen bei Hydronephrose und Pyelonephritis darstellt, steht der Verlust von sehr langkettigen Ceramiden in der Niere in den Biopsien der Patienten im Einklang

mit ihren antiapoptotischen Eigenschaften (Sung *et al.* 2000; Yoo *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang wäre es interessant herauszufinden, ob und wie sich der Verlauf einer renalen Fibrose in Ceramidsynthase-Knockout-Mäusen in einem Tiermodell gegenüber Wildtyp-Tieren ändert.

Wir konnten zeigen, dass sehr langkettige Ceramide in der Niere von Menschen und Mäusen höher konzentriert sind als langkettige Ceramide. Die Mediane von Cer d18:1/24:0 und Cer d18:1/24:1 waren in menschlichen Nieren 4-mal höher in der Nierenrinde und 2-mal höher im Nierenmark im Vergleich zu dem am häufigsten vorkommenden langkettigen Ceramid Cer d18:1/16:0. Nur in Mäusen zeigte Cer d18:1/16:0 vergleichbar hohe Werte wie Cer d18:1/24:0. In den Messungen von Laviad *et al.* war Cer d18:1/16:0 sogar das häufigste Ceramid in den Mäusenieren (Laviad *et al.* 2008). Im Gegensatz zu den Gegebenheiten im menschlichen Nierengewebe war Cer d18:1/16:0 auch in fibrotischen Mäusenieren im Vergleich zu den gesunden signifikant reduziert. Dieser Unterschied ist also eventuell bedingt durch die stark unterschiedlichen Konzentrationen von Cer d18:1/16:0 im humanen und murinen Nierengewebe.

Im Gegensatz zur Reduktion von bestimmten Ceramiden in fibrotischem Nierengewebe, wie wir es in unserer Studie beobachtet haben, wurde andererseits gezeigt, dass ein Cisplatin-induzierter akuter Nierenschaden zu einem Anstieg der Konzentrationen von einigen langkettigen und sehr langkettigen Ceramiden (Cer d18:1/16:0, Cer d18:1/20:0, Cer d18:1/24:1, Cer d18:1/26:0) und deren zugehörigen Hexosylceramiden in der Nierenrinde von C57BL/6J Mäusen führte (Dupre *et al.* 2017). Des Weiteren vermuteten die Autoren, dass eine Unterbindung der Bildung von Hexosylceramiden aus Ceramiden Gewebeschaden, Inflammation und Apoptose verstärkte. Eine Unterscheidung zwischen der Akkumulation von langkettigen im Verhältnis zu sehr langkettigen Ceramiden wurde in der Studie nicht weiter erörtert. Es ist aber wahrscheinlich, dass der Anstieg des proapoptotischen Cer d18:1/16:0 den Krankheitsverlauf stärker beeinflussen konnte als jener, der sehr langkettigen antiapoptotischen Ceramide. Zudem ist bekannt, dass Cisplatin den Anstieg von Ceramiden in direkter Weise bewirkt, wohingegen in unserem Modell die Veränderungen der Ceramide intrinsisch durch den Krankheitsverlauf bedingt wurden (Noda *et al.* 2001; Rebillard *et al.* 2007).

Da wir in unserer Studie Gesamtnierenhomogenisate der Maus verarbeitet haben, war eine Differenzierung zwischen Nierenkortex und Nierenmark, wie es bei den humanen Biopsien gegeben war, nicht möglich. Auffallend war, dass die Ceramidspiegel sich im fibrotischen gegenüber dem gesunden humanen Nierenmarkgewebe nicht unterschieden. Es wurde jedoch auch kein signifikanter Anstieg von fibrotischen Markern in den Nierenmarkproben gemessen, selbst wenn diese fibrotischen Marker in den zugehörigen Proben aus dem Bereich der Nierenrinde signifikant exprimiert waren im Vergleich zu den Kontrollproben. Ob der Abfall der sehr langkettigen Ceramide ein spezifisches Phänomen in der Nierenrinde darstellt, bleibt daher offen. Hinzu kommt, dass die Konzentrationen der sehr langkettigen Ceramide in den Proben aus gesundem Nierenmark viel geringer waren als in den Proben aus gesunder Nierenrinde. Es ist daher davon auszugehen, dass bestimmte Zellen aus der Nierenrinde, zum Beispiel Mesangiumzellen aus den Glomerula, in besonderem Maße Ceramide akkumulieren.

Zusammengefasst konnten wir in dieser Studie zeigen, dass ein Abfall der Konzentrationen von sehr langkettigen Ceramiden mit renaler Fibrose in Menschen und Mäusen einhergeht. Somit ist davon auszugehen, dass in beiden Spezies ähnliche Mechanismen ablaufen und folglich Mausmodelle ein geeignetes Mittel zur Untersuchung von Ceramiden im Hinblick auf die involvierten Enzyme im Kontext von Nierenerkrankungen darstellen. Die Studie wirft interessante Fragen hinsichtlich der Funktion und der Folgen einer Manipulation der Enzyme des Ceramidstoffwechsels auf, welche in weiteren Studien untersucht werden sollten.

### **4.3 Die Rolle des Sphingosin-1-Phosphat-Transporters Spns2 im Kontext der Nierenfibrose**

Die Stimulation von Spns2<sup>-/-</sup> und Spns2<sup>+/+</sup>-mMC mit TFG-β<sub>2</sub> zeigte, dass Spns2 die Expression von CTGF über einen längeren Zeitraum aufrechterhält. Diese Wirkung wurde auch durch eine RNAi-vermittelte Herunterregulation von Spns2 in einer humanen proximalen Tubuluszelllinie nachgewiesen, welche zur verminderten Expression von CTGF und Fibronectin nach Stimulation mit TFG-β<sub>2</sub> führte (Blanchard *et al.* 2018). In den ersten Stunden nach der Stimulation mit TFG-β<sub>2</sub> war die Expression von CTGF in den hier verwendeten mMC beider Genotypen gleich. Dies erscheint



schlüssig, da TFG- $\beta_2$  über Smads direkt die Expression von CTGF induziert (Meng *et al.* 2016). Darüber hinaus induziert der Wachstumsfaktor aber auch die Expression der SK-1 (Yamanaka *et al.* 2004). Über die SK-1 wird vermehrt S1P gebildet, welches über den Transporter Spns2 aus der Zelle geschleust werden kann (Hisano *et al.* 2012). Dadurch kann S1P autokrin und auch parakrin die S1P-Rezeptoren in den Zellmembranen aktivieren, was ebenfalls zur Expression von CTGF führen kann (Li *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2018). Wird das gebildete S1P jedoch nicht ausgeschleust, kann es im Zellkern die Expression von CTGF hemmen (Ren *et al.* 2009). Dieser Effekt war in den durchgeführten Versuchen nach 24 Stunden zu erkennen und besonders deutlich nach 48 Stunden. Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von S1P konnte mittels Massenspektrometrie nicht festgestellt werden. Es scheint somit nicht ausschlaggebend zu sein, dass besonders hohe Mengen an S1P akkumulieren. Maßgeblich ist vermutlich eher die subzelluläre Lokalisation, die darüber entscheidet, ob S1P im Zellkern oder auf der Plasmamembran aktiv werden kann. S1P bewegt sich nicht frei im Zellkulturmedium, sondern ist an Proteinen wie Albumin (im Zellkulturmedium an BSA) gebunden (Adamson *et al.* 2014). Hohe Konzentrationen an S1P in der Zelle würden sich wohl auch deshalb bei fehlendem Transport nicht bilden, da es mehrere enzymatische Wege über Phosphatasen und die S1P-Lyase zum Abbau dieses Lipids gibt, deren Genexpression auch in den hier verwendeten mMC gemessen werden konnten (Pyne *et al.* 2005; Bektas *et al.* 2010). Zudem wurde auch die Genexpression des Transportproteins MRP1 in den mMC mittels RT-qPCR gemessen, welches ebenfalls in der Lage ist S1P zu transportieren. Extrazelluläre Konzentrationen von S1P im Zellkulturmedium waren unter dem Detektionslimit des verfügbaren Verfahrens zur massenspektrometrischen Analyse, weshalb eine Quantifizierung des Exports von S1P nicht überprüft werden konnte. Bestätigt wurde diese Problematik in einer Studie, in welcher sogar extrazellulär zugefügtes S1P auf einem S1P-Lyase-unabhängigen Weg von allen getesteten Zelltypen innerhalb von 30 Minuten abgebaut wurde (Peest *et al.* 2008).

## 5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Rolle von S1P<sub>5</sub> in einem Mausmodell für tubulointerstitielle Fibrose, die Konzentrationsänderungen von spezifischen Ceramiden in fibrotischen Nieren aus dem Menschen und der Maus als auch die Rolle von Spns2 im Kontext der Nierenfibrose *in vitro* untersucht.

Es wurde festgestellt, dass S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse einen milderen Krankheitsverlauf bei der AN gegenüber Wildtypen zeigen. So waren die Schäden im Gewebe, die Entzündungsreaktionen und auch die fibrotischen Prozesse nach 7 und 14 Tagen deutlich geringer in den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen. Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, welche Zellen für diesen Unterschied verantwortlich sind, da sowohl residente Zellen der Niere als auch infiltrierende Immunzellen eine Rolle spielen könnten. Durch die falschpositiven Signale für die Expression von S1P<sub>5</sub> mit der verwendeten TaqMan<sup>®</sup>-Sonde war die Identifikation der relevanten Zelltypen bisher nicht möglich. In nachfolgenden Studien sollten daher Zellen aus der Niere und Immunzellen aus den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen in Experimenten im Vergleich zu Zellen aus Wildtypen untersucht werden. Zukünftige Untersuchungen können zudem mit dem S1P<sub>5</sub>-spezifischen Antagonisten A-971432 im Vergleich zu dem S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>5</sub>-antagonisierenden Sipunimod durchgeführt werden. Hierdurch könnten die spezifischen Effekte der Modulation von S1P<sub>5</sub> sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weiter herausgearbeitet werden. Daraus könnten weitere Indikationen für die therapeutische Verwendung dieser Wirkstoffe als auch mögliche Kontraindikationen für das bereits zugelassene Medikament Sipunimod abgeleitet werden.

In den fibrotischen Nierenrindengeweben aus Patienten und den fibrotischen Nierengeweben aus Mäusen wurden geringere Konzentrationen von sehr langkettigen Ceramiden im Vergleich zu gesunden Nierengewebeproben gefunden. Die Ursache dieser Änderungen scheint somit durch Zellen verursacht zu werden, die hauptsächlich oder ausschließlich in der Nierenrinde zu finden sind. Es wäre daher interessant, Zellen aus der Nierenrinde zu isolieren und ihre Konzentrationen an Ceramiden in Abhängigkeit von profibrotischen und proentzündlichen Faktoren zu vergleichen. Zudem könnten CerS2<sup>-/-</sup>-Mäuse in einem Modell zur Nierenfibrose, induziert durch UUO oder Adenin, untersucht werden, um den Einfluss der sehr langkettigen Ceramide in der Niere im Krankheitsverlauf zu analysieren.

Die Zellkulturversuche mit Spns2<sup>-/-</sup> und Spns2<sup>+/+</sup>-mMC zeigten, dass Spns2 die Expression von CTGF fördert. Mit Hilfe eines GFP-markierten S1P-Rezeptors könnte untersucht werden, ob in Abwesenheit von Spns2 die Rezeptoraktivierung vermindert ist. Zudem könnte die extrazelluläre Konzentration von S1P in Spns2<sup>-/-</sup> und Spns2<sup>+/+</sup>-mMC durch Stimulation mit *caged*-S1P oder Sphingosin in den messbaren Bereich der Massenspektrometrie gesteigert werden. *Caged*-S1P ist hydrophob und kann in die Zellen diffundieren. Über UV-Licht wird es gespalten, wodurch S1P intrazellulär freigesetzt werden kann (Meyer zu Heringdorf *et al.* 2003). Eine Stimulation mit dem membrangängigen Sphingosin führt über die Aktivität der Sphingosinkinasen ebenfalls zu einer Erhöhung der intrazellulären S1P-Konzentrationen (unveröffentlichte Daten). Der rasche Abbau von S1P kann durch die Verwendung des Phosphatase-Inhibitors Natriumorthovanadat verhindert werden (Peest *et al.* 2008). Um den möglichen Export von S1P durch MRP1 zu unterbinden, können MRP1-Inhibitoren wie MK-571 oder Reversan in den Versuchen miteinbezogen werden. Darüber hinaus könnte der Einfluss von Spns2 auch unter der Verwendung der Spns2<sup>-/-</sup> und Spns2<sup>+/+</sup>-Mäuse in einem Modell zur Nierenfibrose wie dem Adenin-Modell oder der UUO analysiert werden.

## 6 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von S1P-Rezeptoren die Expression von profibrotischen Mediatoren, wie dem Bindegewebswachstumsfaktor CTGF, induzieren und deshalb auch eine Rolle bei der Entstehung der Nierenfibrose spielen kann. In diesem Kontext konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Aktivierung von S1P<sub>5</sub> zur TGF- $\beta$ <sub>2</sub>-induzierten CTGF-Expression in humanen glomerulären Mesangiumzellen beiträgt (Wünsche *et al.* 2015). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde deshalb die Rolle von S1P<sub>5</sub> in einem *in vivo*-Modell zur Nierenfibrose untersucht. Männliche S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse und Wildtypmäuse mit C57BL/6J-Hintergrund wurden mit einer adeninreichen Diät für jeweils 7 und 14 Tage gefüttert, um eine tubulointerstitielle Fibrose hervorzurufen. Die Nieren von unbehandelten Mäusen des jeweiligen Genotyps dienten als Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen, dass S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäuse geringere Kreatininplasmaspiegel und weniger Schäden im Nierengewebe gegenüber Wildtypen zeigten. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die mRNA-Expression von mehreren Fibrosemarkern und proinflammatorischen Zytokinen in den S1P<sub>5</sub><sup>-/-</sup>-Mäusen schwächer war als in den Wildtypen. Die Auswertung von histochemischen Färbungen und Western Blots bestätigte diese Beobachtung. Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass S1P<sub>5</sub> eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Adenin-induzierter Entzündung in der Niere und nachfolgender Pathogenese wie Gewebeschäden und Fibrose spielt.

Ceramide sind ein Bestandteil der Lipiddoppelschicht, in allen eukaryotischen Zellen vorhanden und zentrale Moleküle des Sphingolipidstoffwechsels. Die Synthese und der Abbau der Ceramide werden von vielen verschiedenen Enzymen reguliert. Neben ihrer Aufgabe als strukturelle Elemente der Zellmembranen wurde herausgefunden, dass Ceramide auch in verschiedenen Signalwegen involviert sind, die auch bei Nierenerkrankungen eine Rolle spielen. In Bezug auf die Kettenlänge der angehängten Fettsäure können so genannte kurz- und langkettige Ceramide Apoptose induzieren, wohingegen sehr langkettige Ceramide Zellproliferation fördern. In mehreren Studien wurden bereits Konzentrationsänderungen von kettenlängenspezifischen Ceramiden im Plasma und Serum von Patienten gemessen, die zu diesem Zeitpunkt an einer Nierenerkrankung litten. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob solche Konzentrationsänderungen auch im Nierengewebe von Patienten und Mäusen mit

einer Nierenfibrose, dem Kennzeichen nahezu aller chronischen Nierenerkrankungen, zu sehen sind. Zu diesem Zwecke wurden Biopsien der Nierenrinde und des Nierenmarks von fibrotischen Nieren aus Patienten, die an Hydronephrose und/oder Pyelonephritis litten, und von gesunden Gewebeproben untersucht. Letztere wurden durch Nephrektomien zur Behandlung von Nierenkarzinomen gewonnen und dienten als nichtfibrotische Kontrolle. Zum Vergleich mit fibrotischen Nieren aus Mäusen wurden männliche Mäuse der Linie C57BL/6J mit einer adeninreichen Diät für 14 Tage gefüttert. Die Konzentrationen der Sphingolipide wurden mittels Massenspektrometrie gemessen und die Level der fibrotischen Marker wurden mit Hilfe von RT-qPCR und histologischen Färbungen analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die sehr langkettigen Ceramide Cer d18:1/24:0 und Cer d18:1/24:1 sowohl in fibrotischen Nierenrindenproben der Patienten als auch in fibrotischen Nieren der Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollproben signifikant geringer konzentriert waren. Diese Effekte korrelieren mit der Hochregulation der Fibrosemarker COL1 $\alpha$ 1, COL3 $\alpha$ 1 und  $\alpha$ SMA in den fibrotischen Nieren. Es konnte gezeigt werden, dass nur bestimmte Ceramide in fibrotischem Nierengewebe in ihrer Konzentration verändert sind, was interessante Fragen hinsichtlich der Ursache dieser Veränderungen, ihrer funktionellen Aufgabe und zu möglichen Effekten einer Manipulation des Ceramidstoffwechsels mit dem Ziel der Behandlung der Nierenfibrose oder der Entdeckung neuer Biomarker aufwirft. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen zudem die Eignung von *in vivo*-Mausmodellen als translationalen Ansatz für das Verständnis der Beteiligung von Ceramiden in menschlichen Nierenerkrankungen.

Die *in vitro*-Untersuchungen zu der Rolle des S1P-Transporters Spns2 haben gezeigt, dass Spns2 die Expression von CTGF nach Stimulation von Mausmesangiumzellen mit TFG- $\beta$ <sub>2</sub> verstärkt. 24 Stunden nach Stimulation war im Zellkulturüberstand von Spns2<sup>-/-</sup>-mMC im Gegensatz zu Spns2<sup>+/+</sup>-mMC keine Akkumulation des profibrotischen Zytokins CTGF gegenüber der unstimulierten Kontrolle detektierbar. Nach 48 Stunden Stimulation mit TFG- $\beta$ <sub>2</sub> war die Menge an CTGF im Zelllysat als auch im Zellkulturüberstand von Spns2<sup>-/-</sup>-mMC genauso hoch wie in der unstimulierten Kontrolle. Im Zelllysat und im Überstand der Spns2<sup>-/-</sup>-mMC war die Expression von CTGF weiterhin deutlich höher im Vergleich zu den Proben der unstimulierten Zellen. Die basale und TFG- $\beta$ <sub>2</sub>-induzierte Genexpression von S1P-synthetisierenden und

S1P-degradierenden Enzymen, sowie die Konzentrationen an S1P und Sphingosin in den Zellen unterschieden sich zwischen Spns2<sup>-/-</sup>-mMC und Spns2<sup>+/+</sup>-mMC nicht.

## 7 Summary

S1P receptor activation is known to induce the expression of profibrotic mediators such as CTGF and thus might play a role in the progression of renal fibrosis. In this context, we previously showed that S1P<sub>5</sub> activation contributes to the TGF- $\beta$ <sub>2</sub>-induced CTGF expression in human glomerular mesangial cells (Wünsche *et al.* 2015). In this thesis, the role of S1P<sub>5</sub> was investigated in an *in vivo* model of renal fibrosis. Male S1P<sub>5</sub> knockout mice and wildtype mice on C57BL/6J background were fed with an adenine-rich diet for 7 days. The results demonstrate that S1P<sub>5</sub> knockout mice had lower plasma creatinine levels and less tissue damage compared to wildtype mice. Further, the mRNA expression of several fibrotic markers and inflammatory cytokines was diminished in kidneys of S1P<sub>5</sub> knockout mice compared to wildtype mice. Histochemistry and Western Blot analyses of fibrotic markers confirmed these results. Taken together, S1P<sub>5</sub> seems to play an essential role in the onset of adenine-induced renal inflammation, damage and progression of renal fibrosis and might be a promising target for future pharmacological treatment.

Ceramides are a part of the lipid bilayer in all eukaryotic cells and represent central molecules of the sphingolipid metabolism. Ceramide synthesis and degradation are regulated by numerous enzymes. Besides serving as structural elements in cell membranes, ceramides are also known to influence various signaling events involved in the progression of renal diseases. Depending on the chain length of the attached fatty acid, so called short- and long-chain ceramides induce apoptosis whereas very long-chain ceramides promote cell proliferation. In addition, several studies reveal alterations of chain-length specific ceramides in plasma and serum of patients suffering from renal diseases. In this thesis, it was investigated whether such alterations also occur in kidney tissue samples from patients and mice suffering from renal fibrosis, as a hallmark of chronic kidney diseases. For this purpose, human fibrotic kidney samples from renal cortex and renal medulla were collected from nephrectomy specimens with hydronephrosis and/or pyelonephritis. Healthy parts from tumor nephrectomies served as nonfibrotic controls. Mouse fibrotic kidney samples were collected from male C57BL/6J mice treated with an adenine-rich diet for 14 days or were subjected to 7 days of UUO. Kidneys of untreated mice and contralateral kidneys (UUO) served as respective controls. Sphingolipid levels were detected by LC-ESI-MS/MS and

expression levels of fibrotic markers were analyzed by real-time PCR and histological stains. Very long-chain ceramides Cer d18:1/24:0 and Cer d18:1/24:1 were significantly downregulated in both fibrotic human kidney cortex and fibrotic murine kidney compared to respective control samples. These effects correlate with upregulation of COL1 $\alpha$ 1, COL3 $\alpha$ 1 and  $\alpha$ SMA expression in fibrotic human kidney cortex and fibrotic mouse kidney. The results show that specific ceramides are altered in renal fibrosis, which raises interesting questions about their functional role and putative effects of ceramide metabolism manipulations in order to find new treatment strategies for renal fibrosis and potential biomarkers of chronic kidney disease. These findings also support the use of *in vivo* murine models as appropriate translational means to understand the involvement of ceramides in human kidney diseases.

The *in vitro* studies about the role of S1P transporter Spns2 in the context of renal fibrosis showed that Spns2 augments CTGF expression after stimulation with TFG- $\beta$ <sub>2</sub> in renal mesangial cells. There was no accumulation of the profibrotic cytokine CTGF in supernatant of Spns2<sup>-/-</sup>-mMC detectable compared to Spns2<sup>+/+</sup>-mMC after 24 hours of stimulation. 48 hours after stimulation with TFG- $\beta$ <sub>2</sub>, the amount of CTGF in the cell lysate as well as in the supernatant of Spns2<sup>-/-</sup>-mMC was as high as in samples from unstimulated control cells. Basal and TFG- $\beta$ <sub>2</sub>-induced gene expression of enzymes for S1P generation and degradation as well as levels of S1P and sphingosine in mesangial cells did not show any difference between Spns2<sup>-/-</sup>-mMC und Spns2<sup>+/+</sup>-mMC.



## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<i>Adenosine triphosphate binding cassette</i> -Transporter
AN	Adenin-induzierte Nephropathie
$\alpha$ SMA	<i>anti-smooth muscle actin</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP/CTP	Adenosintriphosphat/Cytidintriphosphat/
GTP/TTP	Guanosintriphosphat/Thymidintriphosphat
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
C	Kohlenstoff
Ccl2/MCP-1	C-C Chemokinligand 2/ <i>monocyte chemotactic protein-1</i>
CerS	Ceramidsynthase
Cftr	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene</i>
CoA	Coenzym A
Col1 $\alpha$ 1	Kollagen Typ I alpha 1
Col3 $\alpha$ 1	Kollagen Typ III alpha 1
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DAB	3, 3-Diaminobenzidin

---

DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DN	diabetische Nephropathie
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dNTP	2'-Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDG	<i>endothelial differentiation gene</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N-N-N'-N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FDA	<i>Food and Drug Administration, USA</i>
FKS	Fötale Kälberserum
FN1	Fibronectin 1
g/kg/mg/ $\mu$ g/ng	Gramm/Kilogramm/Milligramm/Mikrogramm/Nanogramm
G <sub>12/13</sub> /G <sub>i/o</sub> /G <sub>q</sub>	G-Protein G <sub>12/13</sub> /G <sub>i/o</sub> /G <sub>q</sub>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h/Min/s	Stunde/Minute/Sekunde
H <sub>2</sub> O/ddH <sub>2</sub> O/	Wasser/ <i>double distilled water</i> (bidestilliertes Wasser)/

---

VE-H <sub>2</sub> O	vollentsalztes (destilliertes) Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HN	Hydronephrose
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IL-1 $\beta$	Interleukin-1-beta
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton / atomare Masseneinheit
KIM-1	<i>kidney injury molecule-1</i>
L/ $\mu$ L/mL	Liter/Mikroliter/Milliliter
LN	Lupus-Nephritis
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid chromatography with electrospray ionization coupled with tandem mass spectrometry</i> / Flüssigchromatographie mit Elektrosprayionisation und Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung
Mfsd2b	<i>major facilitator superfamily domain containing 2b</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mm/cm	Millimeter/Zentimeter
M/mM/ $\mu$ M/nM	Molar/Millimolar/Mikromolar/Nanomolar
mMC	renale Mesangiumzellen aus der Maus
MRP1	<i>multidrug resistance-associated protein 1</i>
MS	Massenspektrometrie

---

n	<i>number</i> (hier: Anzahl der Versuchsproben)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NaF	Natriumflourid
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NLRP3	<i>nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain-containing 3 gene</i>
NP40	Nonidet-P40
PAS	<i>periodic acid-Schiff reaction</i>
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate-buffered saline tween</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PN	Pyelonephritis
Rac	kleine GTPase der Proteinfamilie Rac, Subfamilie Rho
Ras	kleine GTPase der Proteinsuperfamilie Ras
Rho	kleine GTPase der Proteinfamilie Rho, Subfamilie Ras

---

RNA/mRNA/	<i>ribonucleic acid/messenger-RNA</i>
rRNA/RNAi/miRNA	<i>ribosomal-RNA/RNA interference/microRNA</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	<i>reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P <sub>1-5</sub>	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-1 bis 5
SD	Standard deviation / Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> / Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> / Standardfehler
Smad	<i>mothers against decapentaplegic homolog</i>
S1P <sub>5</sub> <sup>-/-</sup> -Mäuse	S1P <sub>5</sub> -defiziente Mäuse
Spns2 <sup>-/-</sup> -Mäuse	Spns2-defiziente Mäuse
Spns2 <sup>+/+</sup> -Mäuse	Spns2-exprimierende Mäuse
SGPP1	Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatase-1/2
SK-1	Sphingosinkinase-1
SK-2	Sphingosinkinase-2
Spns2	Spinster homolog 2
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β <sub>2</sub>	<i>transforming growth factor-β<sub>2</sub></i>

---

TNF $\alpha$	<i>tumor-necrosis factor-alpha</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
UV	Ultraviolett
V/V	Volumen/Volumen
°C	Grad Celsius

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zellen	26
Tabelle 2:	Kulturmedien und Zusätze	26
Tabelle 3:	Zusammensetzung des Wachstumsmediums	27
Tabelle 4:	Zusammensetzung anderer Medien	27
Tabelle 5:	Geräte	28
Tabelle 6:	Chemikalien	29f
Tabelle 7:	Proteine und Reagenzien	31
Tabelle 8:	Antikörper für Western Blot	32
Tabelle 9:	Kits	33
Tabelle 10:	Angesetzte Lösungen	34
Tabelle 11:	Puffer	34
Tabelle 12:	TaqMan <sup>®</sup> -Sonden	35
Tabelle 13:	Primer für die Genotypisierungen	36
Tabelle 14:	Software	36
Tabelle 15:	Verbrauchsmaterialien	37
Tabelle 16:	Zusammensetzung der Trenngellösungen für 2 Gele	52
Tabelle 17:	Zusammensetzung der Sammelgellösung für 2 Gele	52

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Aufbau der Niere	2
Abbildung 2:	Schematischer Aufbau eines Nephrons	3
Abbildung 3:	Histologischer Schnitt durch eine fibrotische Niere	6
Abbildung 4:	Übersicht über die Lokalisation und Stoffwechselwege der Sphingolipide inklusive der beteiligten Enzyme in den verschiedenen Zellkompartimenten	9
Abbildung 5:	Strukturformeln der wichtigsten Vertreter der Sphingolipide	11
Abbildung 6:	Schema des Metabolismus von S1P und der direkte Einfluss auf renale Fibrose	15
Abbildung 7:	Schema der S1P-Rezeptoren und der gekoppelten G-Proteine sowie deren Einfluss auf nachgeschaltete Signalwege	19
Abbildung 8:	Die Substratspezifität der sechs bekannten Ceramidsynthasen	22
Abbildung 9:	Schema der Herstellung des Spns2 <sup>-/-</sup> mittels des Kassettenaustausch-verfahrens	38
Abbildung 10:	Stoffwechselweg für den Abbau von Adenin und die Folgen einer Übersättigung für die Niere	42
Abbildung 11:	Genexpression von S1P <sub>5</sub> in humanen Nierenbiopsien	58
Abbildung 12:	Kreatininkonzentrationen im Plasma der Mäuse	59
Abbildung 13:	Untersuchung auf Gewebeschäden in den Nieren	60
Abbildung 14:	Expression von Nierenschädigungsmarkern	62
Abbildung 15:	Genexpression proinflammatorischer Zytokine	63
Abbildung 16:	Untersuchung der Nieren auf mononukleäre Phagozyten	65
Abbildung 17:	Genexpression von Fibrosemarkern in den Nieren	66
Abbildung 18:	Proteinexpression von Fibrosemarkern in den Nieren	67
Abbildung 19:	Fibrose im Nierengewebe von Kontrollmäusen und AN-Mäusen	68



---

Abbildung 20:	Genexpression der Sphingosinkinasen und des S1P-Transporters Spns2 in den Nieren der gesunden und nierenkranken Mäuse	69
Abbildung 21:	Genexpression der S1P-Rezeptoren	70
Abbildung 22:	Plasmaspiegel von S1P und Sphingosin in gesunden und Nierenkranken Mäusen	71
Abbildung 23:	Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in den fibrotischen und gesunden Kortextgewebeproben	72
Abbildung 24:	Immunhistochemische Färbungen des humanen Nierenkortex	73
Abbildung 25:	Konzentration von Ceramiden bestimmter Kettenlänge im menschlichen Nierenkortex	74
Abbildung 26:	Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in den fibrotischen und gesunden Kortextgewebeproben	75
Abbildung 27:	Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in den fibrotischen und gesunden Nierenmarkgewebeproben	76
Abbildung 28:	Immunhistochemische Färbungen des humanen Nierenmarks	77
Abbildung 29:	Konzentration von Ceramiden bestimmter Kettenlänge im menschlichen Nierenmark	78
Abbildung 30:	Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in den fibrotischen und gesunden Nierenmarkgewebeproben	79
Abbildung 31:	Konzentration von Ceramiden bestimmter Kettenlänge in menschlichen Nierenkortex und Nierenrinde	80
Abbildung 32:	Ergebnis der Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression in den fibrotischen und gesunden Kortextgewebeproben	81
Abbildung 33:	Histochemische Färbungen von Nierenschnitten aus der Maus	82
Abbildung 34:	Konzentration von Ceramiden bestimmter Kettenlänge in Mausnieren	83

---

Abbildung 35: Ergebnis der Real-Time PCR und des Western Blots zur Bestimmung der Expression der Ceramidsynthasen in den fibrotischen und gesunden Nierenproben	84
Abbildung 36: Genexpression von SK-1, Spns2 und S1P-Lyase in mMC	85
Abbildung 37: S1P und Sphingosinkonzentration in mMC	86
Abbildung 38: CTGF-Expression von renalen Mesangiumzellen aus Spns2 <sup>-/-</sup> - und Spns2 <sup>+/+</sup> -Mäusen	87

## 8.4 Literaturverzeichnis

- Adamson, R. H., J. F. Clark, M. Radeva, A. Kheirilomoom, K. W. Ferrara, and F. E. Curry. 2014. "Albumin Modulates S1P Delivery from Red Blood Cells in Perfused Microvessels: Mechanism of the Protein Effect." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 306 (7): H1011–17. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00829.2013>.
- Aleman, Regina, Chris J. van Koppen, Kerstin Danneberg, Michael ter Braak, and Dagmar Meyer zu Heringdorf. 2007. "Regulation and Functional Roles of Sphingosine Kinases." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 374 (5): 413–28. <https://doi.org/10.1007/s00210-007-0132-3>.
- Allende, Maria L., Galina Tuymetova, Bridgin G. Lee, Eliana Bonifacino, Yun-Ping Wu, and Richard L. Proia. 2010. "S1P1 Receptor Directs the Release of Immature B Cells from Bone Marrow into Blood." *Journal of Experimental Medicine* 207 (5): 1113–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20092210>.
- Almaani, Salem, Alexa Meara, and Brad H. Rovin. 2017. "Update on Lupus Nephritis." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 12 (5): 825–35. <https://doi.org/10.2215/CJN.05780616>.
- Alperovich, G, I Rama, N Lloberas, M Franquesa, R Poveda, M Gomà, I Herrero-Fresneda, et al. 2007. "New Immunosuppressor Strategies in the Treatment of Murine Lupus Nephritis." *Lupus* 16 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1177/0961203306073136>.
- Al-Salama, Zaina T. 2019. "Siponimod: First Global Approval." *Drugs*, May. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01140-x>.
- An, Shuxian, Xiujuan Zang, Weijie Yuan, Yifeng Zhuge, and Qing Yu. 2013. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) May Play a Protective Role Against Rats Ischemia/Reperfusion Renal Injury via Inhibiting Tubular Epithelial Cell Apoptosis." *Renal Failure* 35 (1): 143–49. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2012.741877>.
- Ando, Seiichiro, Hirofumi Amano, Eri Amano, Kentaro Minowa, Takashi Watanabe, Soichiro Nakano, Yutaka Nakiri, et al. 2010. "FTY720 Exerts a Survival Advantage through the Prevention of End-Stage Glomerular Inflammation in Lupus-Prone BXSB Mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394 (3): 804–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.078>.

- Anjos Cassado, Alexandra dos. 2017. "F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen." In *Macrophages: Origin, Functions and Biointervention*, edited by Malgorzata Kloc, 161–79. Results and Problems in Cell Differentiation. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_7).
- Arango Duque, Guillermo, and Albert Descoteaux. 2014. "Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases." *Frontiers in Immunology* 5 (October). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>.
- Awad, Alaa S., Michael D. Rouse, Konstantine Khutsishvili, Liping Huang, W. Kline Bolton, Kevin R. Lynch, and Mark D. Okusa. 2011. "Chronic Sphingosine 1-Phosphate 1 Receptor Activation Attenuates Early-Stage Diabetic Nephropathy Independent of Lymphocytes." *Kidney International* 79 (10): 1090–98. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.544>.
- Bajwa, Amandeep, Liping Huang, Elvira Kurmaeva, Joseph C. Gigliotti, Hong Ye, Jacqueline Miller, Diane L. Rosin, Peter I. Lobo, and Mark D. Okusa. 2016. "Sphingosine 1-Phosphate Receptor 3–Deficient Dendritic Cells Modulate Splenic Responses to Ischemia-Reperfusion Injury." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 27 (4): 1076–90. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010095>.
- Bajwa, Amandeep, Sang-Kyung Jo, Hong Ye, Liping Huang, Krishna R. Dondeti, Diane L. Rosin, Volker H. Haase, Timothy L. Macdonald, Kevin R. Lynch, and Mark D. Okusa. 2010. "Activation of Sphingosine-1-Phosphate 1 Receptor in the Proximal Tubule Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury." *Journal of the American Society of Nephrology* 21 (6): 955–65. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009060662>.
- Bajwa, Amandeep, Diane L. Rosin, Piotr Chroscicki, Sangju Lee, Krishna Dondeti, Hong Ye, Gilbert R. Kinsey, et al. 2015. "Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 Enhances Mitochondrial Function and Reduces Cisplatin-Induced Tubule Injury." *Journal of the American Society of Nephrology* 26 (4): 908–25. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013121351>.
- Barnawi, Jameel, Hubertus Jersmann, Rainer Haberberger, Sandra Hodge, and Robyn Meech. 2017. "Reduced DNA Methylation of Sphingosine-1 Phosphate Receptor 5 in Alveolar Macrophages in COPD: A Potential Link to Failed Efferocytosis." *Respirology* 22 (2): 315–21. <https://doi.org/10.1111/resp.12949>.

- Barnawi, Jameel, Hai Tran, Hubertus Jersmann, Stuart Pitson, Eugene Roscioli, Greg Hodge, Robyn Meech, Rainer Haberberger, and Sandra Hodge. 2015. "Potential Link between the Sphingosine-1-Phosphate (S1P) System and Defective Alveolar Macrophage Phagocytic Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)." *PLOS ONE* 10 (10): e0122771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122771>.
- Bazarganipour, Sarah, Johannes Hausmann, Stephanie Oertel, Khadija El-Hindi, Sebastian Brachtendorf, Irina Blumenstein, Alica Kubesch, et al. 2019. "The Lipid Status in Patients with Ulcerative Colitis: Sphingolipids Are Disease-Dependent Regulated." *Journal of Clinical Medicine* 8 (7). <https://doi.org/10.3390/jcm8070971>.
- Bekpinar, S., G. Yenidunya, F. Gurdol, Y. Unlucerci, E. Aycan-Ustyol, and N. Dinccag. 2015. "The Effect of Nephropathy on Plasma Sphingosine 1-Phosphate Concentrations in Patients with Type 2 Diabetes." *Clinical Biochemistry* 48 (18): 1264–67. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.08.001>.
- Bektas, Meryem, Maria Laura Allende, Bridgin G. Lee, Weiping Chen, Marcelo J. Amar, Alan T. Remaley, Julie D. Saba, and Richard L. Proia. 2010. "Sphingosine 1-Phosphate Lyase Deficiency Disrupts Lipid Homeostasis in Liver." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (14): 10880–89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081489>.
- Benito, S., A. Sánchez-Ortega, N. Unceta, F. Andrade, L. Aldámiz-Echevarria, M. A. Goicolea, and R. J. Barrio. 2018. "Untargeted Metabolomics for Plasma Biomarker Discovery for Early Chronic Kidney Disease Diagnosis in Pediatric Patients Using LC-QTOF-MS." *Analyst* 143 (18): 4448–58. <https://doi.org/10.1039/C8AN00864G>.
- Blanchard, Olivier, Bisera Stepanovska, Manuel Starck, Martin Erhardt, Isolde Römer, Dagmar Meyer zu Heringdorf, Josef Pfeilschifter, Uwe Zangemeister-Wittke, and Andrea Huwiler. 2018. "Downregulation of the S1P Transporter Spinster Homology Protein 2 (Spns2) Exerts an Anti-Fibrotic and Anti-Inflammatory Effect in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (5): 1498. <https://doi.org/10.3390/ijms19051498>.
- Bolignano, Davide, Valentina Donato, Giuseppe Coppolino, Susanna Campo, Antoine Buemi, Antonio Lacquaniti, and Michele Buemi. 2008. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage." *American Journal of Kidney Diseases* 52 (3): 595–605. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.01.020>.

- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72 (1): 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brinkmann, Volker. 2007. "Sphingosine 1-Phosphate Receptors in Health and Disease: Mechanistic Insights from Gene Deletion Studies and Reverse Pharmacology." *Pharmacology & Therapeutics* 115 (1): 84–105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.006>.
- Brinkmann, Volker, Jason G. Cyster, and Timothy Hla. 2004. "FTY720: Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 in the Control of Lymphocyte Egress and Endothelial Barrier Function." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (7): 1019–25. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00476.x>.
- Brodie, Malcolm, Michael C. McKean, Gail E. Johnson, Joe Gray, Andrew J. Fisher, Paul A. Corris, James L. Lordan, and Christopher Ward. 2010. "Ceramide Is Increased in the Lower Airway Epithelium of People with Advanced Cystic Fibrosis Lung Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182 (3): 369–75. <https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0799OC>.
- Brunkhorst, R., F. Friedlaender, N. Ferreirós, S. Schwalm, A. Koch, G. Grammatikos, S. Toennes, C. Foerch, J. Pfeilschifter, and W. Pfeilschifter. 2015. "Alterations of the Ceramide Metabolism in the Peri-Infarct Cortex Are Independent of the Sphingomyelinase Pathway and Not Influenced by the Acid Sphingomyelinase Inhibitor Fluoxetine." *Neural Plasticity* 2015: 503079. <https://doi.org/10.1155/2015/503079>.
- Brunkhorst, Robert, Waltraud Pfeilschifter, Sammy Patyna, Stefan Büttner, Timon Eckes, Sandra Trautmann, Dominique Thomas, Josef Pfeilschifter, and Alexander Koch. 2018. "Preanalytical Biases in the Measurement of Human Blood Sphingolipids." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051390>.
- Cao, Qi, Yiping Wang, Xin Maggie Wang, Junyu Lu, Vincent W. S. Lee, Qianling Ye, Hanh Nguyen, et al. 2015. "Renal F4/80+CD11c+ Mononuclear Phagocytes Display Phenotypic and Functional Characteristics of Macrophages in Health and in Adriamycin Nephropathy." *Journal of the American Society of Nephrology* 26 (2): 349–63. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013121336>.
- Cartwright, Tara A., Christopher R. Campos, Ronald E. Cannon, and David S. Miller. 2013. "Mrp1 Is Essential for Sphingolipid Signaling to P-Glycoprotein in Mouse Blood–Brain and Blood–Spinal Cord Barriers." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33 (3): 381–388.

- Chang, Chi-Lun, Ming-Chih Ho, Po-Huang Lee, Chi-Yen Hsu, Wei-Pang Huang, and Hsinyu Lee. 2009. "S1P5 Is Required for Sphingosine 1-Phosphate-Induced Autophagy in Human Prostate Cancer PC-3 Cells." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 297 (2): C451–58. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00586.2008>.
- Checa, A, H Idborg, A Zandian, D Garcia Sar, I Surowiec, J Trygg, E Svenungsson, et al. 2017. "Dysregulations in Circulating Sphingolipids Associate with Disease Activity Indices in Female Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Cross-Sectional Study." *Lupus* 26 (10): 1023–33. <https://doi.org/10.1177/0961203316686707>.
- Chen, Jing, Neil Ingham, John Kelly, Shalini Jadeja, David Goulding, Johanna Pass, Vinit B. Mahajan, et al. 2014. "Spinster Homolog 2 (Spns2) Deficiency Causes Early Onset Progressive Hearing Loss." *PLOS Genetics* 10 (10): e1004688. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004688>.
- Cheng, Jung-Chien, Evan Y. Wang, Yuyin Yi, Avinash Thakur, Shu-Huei Tsai, and Pamela A. Hoodless. 2018. "S1P Stimulates Proliferation by Upregulating CTGF Expression through S1PR2-Mediated YAP Activation." *Molecular Cancer Research* 16 (10): 1543–55. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0681>.
- Chun, Jerold, and Hans-Peter Hartung. 2010. "Mechanism of Action of Oral Fingolimod (FTY720) in Multiple Sclerosis." *Clinical Neuropharmacology* 33 (2): 91–101. <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e3181cbf825>.
- Cutler, Roy G., Jeremiah Kelly, Kristin Storie, Ward A. Pedersen, Anita Tammara, Kimmo Hatanpaa, Juan C. Troncoso, and Mark P. Mattson. 2004. "Involvement of Oxidative Stress-Induced Abnormalities in Ceramide and Cholesterol Metabolism in Brain Aging and Alzheimer's Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7): 2070–75. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305799101>.
- Cuvillier, O., G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, S. Gutkind, and S. Spiegel. 1996. "Suppression of Ceramide-Mediated Programmed Cell Death by Sphingosine-1-Phosphate." *Nature* 381 (6585): 800–803. <https://doi.org/10.1038/381800a0>.
- Daha, M. R., and C. van Kooten. 2000. "Is the Proximal Tubular Cell a Proinflammatory Cell?" *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 15 Suppl 6: 41–43.

- Debien, Emilie, Katia Mayol, Vincent Biajoux, Cécile Daussy, Mercedes Gomez De Agüero, Morgan Taillardet, Nicolas Dagany, et al. 2013. "S1PR5 Is Pivotal for the Homeostasis of Patrolling Monocytes." *European Journal of Immunology* 43 (6): 1667–75. <https://doi.org/10.1002/eji.201343312>.
- Denic, Aleksandar, Richard J. Glassock, and Andrew D. Rule. 2016. "Structural and Functional Changes With the Aging Kidney." *Advances in Chronic Kidney Disease, CKD and the Elderly*, 23 (1): 19–28. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2015.08.004>.
- Di Pardo, Alba, Salvatore Castaldo, Enrico Amico, Giuseppe Pepe, Federico Marracino, Luca Capocci, Alfredo Giovannelli, et al. 2018. "Stimulation of S1PR5 with A-971432, a Selective Agonist, Preserves Blood-Brain Barrier Integrity and Exerts Therapeutic Effect in an Animal Model of Huntington's Disease." *Human Molecular Genetics* 27 (14): 2490–2501. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy153>.
- Donoviel, Michael S., Nitai C. Hait, Subramaniam Ramachandran, Michael Maceyka, Kazuaki Takabe, Sheldon Milstien, Tamas Oravec, and Sarah Spiegel. 2015. "Spinster 2, a Sphingosine-1-Phosphate Transporter, Plays a Critical Role in Inflammatory and Autoimmune Diseases." *The FASEB Journal* 29 (12): 5018–28. <https://doi.org/10.1096/fj.15-274936>.
- Drouillard, Annabelle, Anne-Laure Mathieu, Antoine Marçais, Alexandre Belot, Sébastien Viel, Michaël Mingueneau, Kevin Guckian, and Thierry Walzer. 2018. "S1PR5 Is Essential for Human Natural Killer Cell Migration toward Sphingosine-1 Phosphate." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (6): 2265-2268.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.022>.
- Du, Chunyang, Yunzhuo Ren, Fang Yao, Jialiang Duan, Hui'er Zhao, Yunxia Du, Xia Xiao, Huijun Duan, and Yonghong Shi. 2017. "Sphingosine Kinase 1 Protects Renal Tubular Epithelial Cells from Renal Fibrosis via Induction of Autophagy." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 90 (July): 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.07.011>.
- Duffield, Jeremy S. 2010. "Macrophages and Immunologic Inflammation of the Kidney." *Seminars in Nephrology* 30 (3): 234–54. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.03.003>.
- Duong, Chinh Quoc, Salim Maa Bared, Ahmad Abu-Khader, Christa Buechler, Anna Schmitz, and Gerd Schmitz. 2004. "Expression of the Lysophospholipid Receptor Family and Investigation of Lysophospholipid-Mediated Responses in Human Macrophages." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1682 (1–3): 112–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.03.002>.



- Dupre, Tess V., Mark A. Doll, Parag P. Shah, Cierra N. Sharp, Deanna Siow, Judit Megyesi, James Shayman, et al. 2017. "Inhibiting Glucosylceramide Synthase Exacerbates Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury." *Journal of Lipid Research*, jlr-M076745.
- Eardley, K. S., D. Zehnder, M. Quinkler, J. Lepenies, R. L. Bates, C. O. Savage, A. J. Howie, D. Adu, and P. Cockwell. 2006. "The Relationship between Albuminuria, MCP-1/CCL2, and Interstitial Macrophages in Chronic Kidney Disease." *Kidney International* 69 (7): 1189–97. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000212>.
- Edsall, L. C., O. Cuvillier, S. Twitty, S. Spiegel, and S. Milstien. 2001. "Sphingosine Kinase Expression Regulates Apoptosis and Caspase Activation in PC12 Cells." *Journal of Neurochemistry* 76 (5): 1573–84. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00164.x>.
- Esteban, Vanesa, Oscar Lorenzo, Mónica Rupérez, Yusuke Suzuki, Sergio Mezzano, Julia Blanco, Mathias Kretzler, Takeshi Sugaya, Jesús Egido, and Marta Ruiz-Ortega. 2004. "Angiotensin II, via AT1 and AT2 Receptors and NF-KB Pathway, Regulates the Inflammatory Response in Unilateral Ureteral Obstruction." *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (6): 1514–29. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000130564.75008.F5>.
- Eum, Jung Yong, Jong Cheol Lee, Sun Shin Yi, Il Yong Kim, Je Kyung Seong, and Myeong Hee Moon. 2020. "Aging-Related Lipidomic Changes in Mouse Serum, Kidney, and Heart by Nanoflow Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography A*, January, 460849. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460849>.
- Fagerberg, Linn, Björn M. Hallström, Per Oksvold, Caroline Kampf, Dijana Djureinovic, Jacob Odeberg, Masato Habuka, et al. 2014. "Analysis of the Human Tissue-Specific Expression by Genome-Wide Integration of Transcriptomics and Antibody-Based Proteomics." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13 (2): 397–406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>.
- Fang, Chao, Ganlan Bian, Pan Ren, Jie Xiang, Jun Song, Caiyong Yu, Qian Zhang, et al. 2018. "S1P Transporter SPNS2 Regulates Proper Postnatal Retinal Morphogenesis." *The FASEB Journal* 32 (7): 3597–3613. <https://doi.org/10.1096/fj.201701116R>.
- Futerman, Anthony H., and Yusuf A. Hannun. 2004. "The Complex Life of Simple Sphingolipids." *EMBO Reports* 5 (8): 777–82. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400208>.

- Galadari, Sehamuddin, Anees Rahman, Siraj Pallichankandy, Alaa Galadari, and Faisal Thayyullathil. 2013. "Role of Ceramide in Diabetes Mellitus: Evidence and Mechanisms." *Lipids in Health and Disease* 12 (July): 98. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-98>.
- Garić, Dušan, Juan B. De Sanctis, Gabriella Wojewodka, Daniel Houle, Shanon Cupri, Asmahan Abu-Arish, John W. Hanrahan, Marian Hajduch, Elias Matouk, and Danuta Radzioch. 2017. "Fenretinide Differentially Modulates the Levels of Long- and Very Long-Chain Ceramides by Downregulating Cers5 Enzyme: Evidence from Bench to Bedside." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 95 (10): 1053–64. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1564-y>.
- Geissmann, Frederic, Steffen Jung, and Dan R. Littman. 2003. "Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties." *Immunity* 19 (1): 71–82.
- Genovese, Federica, Alba A. Manresa, Diana Julie Leeming, Morten Asser Karsdal, and Peter Boor. 2014. "The Extracellular Matrix in the Kidney: A Source of Novel Non-Invasive Biomarkers of Kidney Fibrosis?" *Fibrogenesis & Tissue Repair* 7 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-7-4>.
- Glaenzel, Ulrike, Yi Jin, Robert Nufer, Wenkui Li, Kirsten Schroer, Sylvie Adam-Stitah, Sjoerd Peter van Marle, et al. 2018. "Metabolism and Disposition of Siponimod, a Novel Selective S1P1/S1P5 Agonist, in Healthy Volunteers and In Vitro Identification of Human Cytochrome P450 Enzymes Involved in Its Oxidative Metabolism." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 46 (7): 1001–13. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.079574>.
- Golfier, Sven, Shinichi Kondo, Tobias Schulze, Tomomi Takeuchi, Galya Vassileva, Ariel H. Achtman, Markus H. Gräler, et al. 2010. "Shaping of Terminal Megakaryocyte Differentiation and Proplatelet Development by Sphingosine-1-Phosphate Receptor S1P4." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (12): 4701–10. <https://doi.org/10.1096/fj.09-141473>.
- Gomez, Ivan G., Deidre A. MacKenna, Bryce G. Johnson, Vivek Kaimal, Allie M. Roach, Shuyu Ren, Naoki Nakagawa, et al. 2015. "Anti-MicroRNA-21 Oligonucleotides Prevent Alport Nephropathy Progression by Stimulating Metabolic Pathways." *The Journal of Clinical Investigation* 125 (1): 141–56. <https://doi.org/10.1172/JCI75852>.
- Gottschalk, Catherine, and Christian Kurts. 2015. "The Debate about Dendritic Cells and Macrophages in the Kidney." *Frontiers in Immunology* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00435>.

- Gräler, Markus H., Günter Bernhardt, and Martin Lipp. 1998. "EDG6, a Novel G-Protein-Coupled Receptor Related to Receptors for Bioactive Lysophospholipids, Is Specifically Expressed in Lymphoid Tissue." *Genomics* 53 (2): 164–69. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5491>.
- Gräler, Markus H., Robert Grosse, Angelika Kusch, Elisabeth Kremmer, Thomas Gudermann, and Martin Lipp. 2003. "The Sphingosine 1-Phosphate Receptor S1P4 Regulates Cell Shape and Motility via Coupling to Gi and G12/13." *Journal of Cellular Biochemistry* 89 (3): 507–19. <https://doi.org/10.1002/jcb.10537>.
- Grammatikos, Georgios, Niklas Schoell, Nerea Ferreirós, Dimitra Bon, Eva Herrmann, Harald Farnik, Verena Köberle, et al. 2016. "Serum Sphingolipidomic Analyses Reveal an Upregulation of C16-Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Hepatocellular Carcinoma." *Oncotarget* 7 (14): 18095–105. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7741>.
- Grande, M. Teresa, Berta Sánchez-Laorden, Cristina López-Blau, Cristina A. De Frutos, Agnès Boutet, Miguel Arévalo, R. Grant Rowe, Stephen J. Weiss, José M. López-Novoa, and M. Angela Nieto. 2015. "Snail1-Induced Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition Drives Renal Fibrosis in Mice and Can Be Targeted to Reverse Established Disease." *Nature Medicine* 21 (9): 989–97. <https://doi.org/10.1038/nm.3901>.
- Grösch, Sabine, Susanne Schiffmann, and Gerd Geisslinger. 2012. "Chain Length-Specific Properties of Ceramides." *Progress in Lipid Research* 51 (1): 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.11.001>.
- Grupp, Clemens, Ilka Troche, Carmen Klass, Matthias Köhler, and Gerhard Anton Müller. 2001. "A Novel Model to Study Renal Myofibroblast Formation in Vitro." *Kidney International* 59 (2): 543–53. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.059002543.x>.
- Guilbault, Claudine, Juan B. De Sanctis, Gabriella Wojewodka, Zienab Saeed, Claude Lachance, Thomas A. A. Skinner, Regina M. Vilela, et al. 2008. "Fenretinide Corrects Newly Found Ceramide Deficiency in Cystic Fibrosis." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 38 (1): 47–56. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0036OC>.
- Han, Mei, Ying Li, Di Wen, Maodong Liu, Yuteng Ma, and Bin Cong. 2018. "NGAL Protects against Endotoxin-Induced Renal Tubular Cell Damage by Suppressing Apoptosis." *BMC Nephrology* 19 (1): 168. <https://doi.org/10.1186/s12882-018-0977-3>.

- Han, W. K., S. S. Waikar, A. Johnson, R. A. Betensky, C. L. Dent, P. Devarajan, and J. V. Bonventre. 2008. "Urinary Biomarkers in the Early Diagnosis of Acute Kidney Injury." *Kidney International* 73 (7): 863–69. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002715>.
- Han, Won K., Veronique Bailly, Rekha Abichandani, Ravi Thadhani, and Joseph V. Bonventre. 2002. "Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A Novel Biomarker for Human Renal Proximal Tubule Injury." *Kidney International* 62 (1): 237–44. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x>.
- Hanada, Kentaro, Keigo Kumagai, Satoshi Yasuda, Yukiko Miura, Miyuki Kawano, Masayoshi Fukasawa, and Masahiro Nishijima. 2003. "Molecular Machinery for Non-Vesicular Trafficking of Ceramide." *Nature* 426 (6968): 803–9. <https://doi.org/10.1038/nature02188>.
- Hänel, Petra, Paul Andréani, and Markus H. Gräler. 2007. "Erythrocytes Store and Release Sphingosine 1-Phosphate in Blood." *The FASEB Journal* 21 (4): 1202–9. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7433com>.
- Hannun, Y. A., and R. M. Bell. 1989. "Functions of Sphingolipids and Sphingolipid Breakdown Products in Cellular Regulation." *Science* 243 (4890): 500–507. <https://doi.org/10.1126/science.2643164>.
- Hanson, Michael A., and Robert Peach. 2014. "Structural Biology of the S1P1 Receptor." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 378: 23–53. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-05879-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-05879-5_2).
- Hartmann, Daniela, Marthe-Susanna Wegner, Ruth Anna Wanger, Nerea Ferreirós, Yannick Schreiber, Jessica Lucks, Susanne Schiffmann, Gerd Geisslinger, and Sabine Grösch. 2013. "The Equilibrium between Long and Very Long Chain Ceramides Is Important for the Fate of the Cell and Can Be Influenced by Co-Expression of CerS." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (7): 1195–1203. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.012>.
- Haus, Jacob M., Sangeeta R. Kashyap, Takhar Kasumov, Renliang Zhang, Karen R. Kelly, Ralph A. Defronzo, and John P. Kirwan. 2009. "Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects with Type 2 Diabetes and Correlate with the Severity of Insulin Resistance." *Diabetes* 58 (2): 337–43. <https://doi.org/10.2337/db08-1228>.
- Havulinna, Aki S., Marko Sysi-Aho, Mika Hilvo, Dimple Kauhanen, Reini Hurme, Kim Ekroos, Veikko Salomaa, and Reijo Laaksonen. 2016. "Circulating Ceramides Predict Cardiovascular Outcomes in the Population-Based FINRISK 2002 Cohort." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36 (12): 2424–30. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307497>.

- Hermann, Viktoria, Anastas Batalov, Svetlana Smakotina, Pierre-Eric Juif, and Peter Cornelisse. 2019. "First Use of Cenerimod, a Selective S1P1 Receptor Modulator, for the Treatment of SLE: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Proof-of-Concept Study." *Lupus Science & Medicine* 6 (1): e000354. <https://doi.org/10.1136/lupus-2019-000354>.
- Hewitson, Tim D. 2012. "Fibrosis in the Kidney: Is a Problem Shared a Problem Halved?" *Fibrogenesis & Tissue Repair* 5 (Suppl 1): S14. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-S1-S14>.
- Hisano, Yu, Naoki Kobayashi, Atsuo Kawahara, Akihito Yamaguchi, and Tsuyoshi Nishi. 2011. "The Sphingosine 1-Phosphate Transporter, SPNS2, Functions as a Transporter of the Phosphorylated Form of the Immunomodulating Agent FTY720." *Journal of Biological Chemistry* 286 (3): 1758–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.171116>.
- Hisano, Yu, Naoki Kobayashi, Akihito Yamaguchi, and Tsuyoshi Nishi. 2012. "Mouse SPNS2 Functions as a Sphingosine-1-Phosphate Transporter in Vascular Endothelial Cells." Edited by David Holowka. *PLoS ONE* 7 (6): e38941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038941>.
- Hoerger, Thomas J., John S. Wittenborn, Joel E. Segel, Nilka R. Burrows, Kumiko Imai, Paul Eggers, Meda E. Pavkov, et al. 2010. "A Health Policy Model of CKD: 1. Model Construction, Assumptions, and Validation of Health Consequences." *American Journal of Kidney Diseases* 55 (3): 452–62. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.11.016>.
- Huwiler, Andrea, and Josef Pfeilschifter. 2018. "Sphingolipid Signaling in Renal Fibrosis." *Matrix Biology, SI : Fibrosis – Mechanisms and Translational Aspects*, 68–69 (August): 230–47. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.006>.
- Huwiler, A., T. Kolter, J. Pfeilschifter, and K. Sandhoff. 2000. "Physiology and Pathophysiology of Sphingolipid Metabolism and Signaling." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1485 (2–3): 63–99. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00042-1](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00042-1).
- Igarashi, Nobuaki, Taro Okada, Shun Hayashi, Toshitada Fujita, Saleem Jahangeer, and Shun-ichi Nakamura. 2003. "Sphingosine Kinase 2 Is a Nuclear Protein and Inhibits DNA Synthesis." *Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 46832–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306577200>.

- Ikeda, Hitoshi, Naoko Watanabe, Isao Ishii, Tatsuo Shimosawa, Yukio Kume, Tomoaki Tomiya, Yukiko Inoue, et al. 2009. "Sphingosine 1-Phosphate Regulates Regeneration and Fibrosis after Liver Injury via Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2." *Journal of Lipid Research* 50 (3): 556–64. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800496-JLR200>.
- Im, D. S., C. E. Heise, N. Ancellin, B. F. O'Dowd, G. J. Shei, R. P. Heavens, M. R. Rigby, et al. 2000. "Characterization of a Novel Sphingosine 1-Phosphate Receptor, Edg-8." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (19): 14281–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14281>.
- Imeri, Faik, Olivier Blanchard, Aurelio Jenni, Stephanie Schwalm, Christin Wünsche, Aleksandra Zivkovic, Holger Stark, Josef Pfeilschifter, and Andrea Huwiler. 2015. "FTY720 and Two Novel Butterfly Derivatives Exert a General Anti-Inflammatory Potential by Reducing Immune Cell Adhesion to Endothelial Cells through Activation of S1P(3) and Phosphoinositide 3-Kinase." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 388 (12): 1283–92. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1159-5>.
- Imran, Tasnim F., Frederick Yick, Suneet Verma, Christopher Estiverne, Chinonye Ogbonnaya-Odor, Srikanth Thiruvardsothy, Alluru S. Reddi, and Neil Kothari. 2016. "Lupus Nephritis: An Update." *Clinical and Experimental Nephrology* 20 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10157-015-1179-y>.
- Ishii, Isao, Beth Friedman, Xiaoqin Ye, Shuji Kawamura, Christine McGiffert, James J. A. Contos, Marcy A. Kingsbury, Guangfa Zhang, Joan Heller Brown, and Jerold Chun. 2001. "Selective Loss of Sphingosine 1-Phosphate Signaling with No Obvious Phenotypic Abnormality in Mice Lacking Its G Protein-Coupled Receptor, LPB3/EDG-3." *Journal of Biological Chemistry* 276 (36): 33697–704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104441200>.
- Ishizawa, Sho, Junko Takahashi-Fujigasaki, Yasushi Kanazawa, Keiichiro Matoba, Daiji Kawanami, Tamotsu Yokota, Takeo Iwamoto, Naoko Tajima, Yoshinobu Manome, and Kazunori Utsunomiya. 2014. "Sphingosine-1-Phosphate Induces Differentiation of Cultured Renal Tubular Epithelial Cells under Rho Kinase Activation via the S1P2 Receptor." *Clinical and Experimental Nephrology* 18 (6): 844–52. <https://doi.org/10.1007/s10157-014-0933-x>.
- Jarman, Kate E., Paul A. B. Moretti, Julia R. Zebol, and Stuart M. Pitson. 2010. "Translocation of Sphingosine Kinase 1 to the Plasma Membrane Is Mediated by Calcium- and Integrin-Binding Protein 1." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (1): 483–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068395>.

- Jenne, Craig N., Anselm Enders, Richard Rivera, Susan R. Watson, Alexander J. Bankovich, Joao P. Pereira, Ying Xu, et al. 2009. "T-Bet–Dependent S1P5 Expression in NK Cells Promotes Egress from Lymph Nodes and Bone Marrow." *Journal of Experimental Medicine* 206 (11): 2469–81. <https://doi.org/10.1084/jem.20090525>.
- Jia, Ting, Hannes Olauson, Karolina Lindberg, Risul Amin, Karin Edvardsson, Bengt Lindholm, Göran Andersson, et al. 2013. "A Novel Model of Adenine-Induced Tubulointerstitial Nephropathy in Mice." *BMC Nephrology* 14 (May): 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-116>.
- Jo, Sang-Kyung, Amandeep Bajwa, Hong Ye, Amy L. Vergis, Alaa S. Awad, Yugesh Kharel, Kevin R. Lynch, and Mark D. Okusa. 2009. "Divergent Roles of Sphingosine Kinases in Kidney Ischemia–Reperfusion Injury." *Kidney International* 75 (2): 167–175.
- Kajander, Kajsa, Eveliina Myllyluoma, Sinikka Kyrönpalo, Martin Rasmussen, Pentti Sipponen, Ismo Mattila, Tuulikki Seppänen-Laakso, Heikki Vapaatalo, Matej Oresic, and Riitta Korpela. 2009. "Elevated Pro-Inflammatory and Lipotoxic Mucosal Lipids Characterise Irritable Bowel Syndrome." *World Journal of Gastroenterology* 15 (48): 6068–74. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.6068>.
- Kang, Hyun Mi, Seon Ho Ahn, Peter Choi, Yi-An Ko, Seung Hyeok Han, Frank Chinga, Ae Seo Deok Park, et al. 2015. "Defective Fatty Acid Oxidation in Renal Tubular Epithelial Cells Has a Key Role in Kidney Fibrosis Development." *Nature Medicine* 21 (1): 37–46. <https://doi.org/10.1038/nm.3762>.
- Kanzler, Stephan, Ansgar W. Lohse, Andrea Keil, Jürgen Henninger, Hans P. Dienes, Peter Schirmacher, Stefan Rose-John, Karl H. Meyer Zum Büschenfelde, and Manfred Blessing. 1999. "TGF-B1 in Liver Fibrosis: An Inducible Transgenic Mouse Model to Study Liver Fibrogenesis." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 276 (4): G1059–68. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.4.G1059>.
- Kawahara, Atsuo, Tsuyoshi Nishi, Yu Hisano, Hajime Fukui, Akihito Yamaguchi, and Naoki Mochizuki. 2009. "The Sphingolipid Transporter Spns2 Functions in Migration of Zebrafish Myocardial Precursors." *Science* 323 (5913): 524–27. <https://doi.org/10.1126/science.1167449>.
- "KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update." 2012. *American Journal of Kidney Diseases* 60 (5): 850–86. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.07.005>.

- Ke, Po-Yuan, and Steve S.-L. Chen. 2012. "Hepatitis C Virus and Cellular Stress Response: Implications to Molecular Pathogenesis of Liver Diseases." *Viruses* 4 (10): 2251–90. <https://doi.org/10.3390/v4102251>.
- Kendig, Derek M., Alec K. Matsumoto, and Robert S. Moreland. 2013. "Sphingosine-1-Phosphate Induced Contraction of Bladder Smooth Muscle." *European Journal of Pharmacology* 720 (0). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.004>.
- Khayrullin, Andrew, Priyanka Krishnan, Luis Martinez-Nater, Bharati Mendhe, Sadanand Fulzele, Yutao Liu, Julie A. Mattison, and Mark W. Hamrick. 2019. "Very Long-Chain C24:1 Ceramide Is Increased in Serum Extracellular Vesicles with Aging and Can Induce Senescence in Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Cells* 8 (1). <https://doi.org/10.3390/cells8010037>.
- Kim, Su-Mi, Sang-Ho Lee, Yang-Gyun Kim, Se-Yun Kim, Jung-Woo Seo, Young-Wook Choi, Dong-Jin Kim, et al. 2015. "Hyperuricemia-Induced NLRP3 Activation of Macrophages Contributes to the Progression of Diabetic Nephropathy." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 308 (9): F993–1003. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00637.2014>.
- Klessens, Celine Q. F., Malu Zandbergen, Ron Wolterbeek, Jan A. Bruijn, Ton J. Rabelink, Ingeborg M. Bajema, and Daphne H. T. IJpelaar. 2017. "Macrophages in Diabetic Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes." *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 32 (8): 1322–29. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw260>.
- Klinge, Matthias, and Doreen Brodmann, eds. 2017. *Einführung in die Nephrologie und Nierenersatzverfahren*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54583-6>.
- Koch, Alexander, Josef Pfeilschifter, and Andrea Huwiler. 2013. "Sphingosine 1-Phosphate in Renal Diseases." *Cellular Physiology and Biochemistry* 31 (6): 745–60. <https://doi.org/10.1159/000350093>.
- Kong, Ping, Panagiota Christia, and Nikolaos G. Frangogiannis. 2014. "The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis." *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (4): 549–74. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1349-6>.
- Kono, Mari, Inna A. Belyantseva, Athanasia Skoura, Gregory I. Frolenkov, Matthew F. Starost, Jennifer L. Dreier, Darcy Lidington, et al. 2007. "Deafness and Stria Vascularis Defects in S1P2 Receptor-Null Mice." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (14): 10690–96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700370200>.



- Kuć, Kamil, Paweł Kiciński, Sylwia Przybylska-Kuć, Jerzy Mosiewicz, and Wojciech Myśliński. 2010. "[Serum creatinine level and eGFR as the indices of renal function in present-day clinical practice]." *Przegląd Lekarski* 67 (7): 491–95.
- LaBach, J. P., and D. C. White. 1969. "Identification of Ceramide Phosphorylethanolamine and Ceramide Phosphorylglycerol in the Lipids of an Anaerobic Bacterium." *Journal of Lipid Research* 10 (5): 528–34.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259): 680–85.  
<https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lai, Li-Wen, K. C. Yong, S. Igarashi, and Y.-Hh Lien. 2007. "A Sphingosine-1-Phosphate Type 1 Receptor Agonist Inhibits the Early T-Cell Transient Following Renal Ischemia–Reperfusion Injury." *Kidney International* 71 (12): 1223–1231.
- Larsen, Reinhard. 2016. *Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege*. 9th ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-50444-4>.
- Laviad, Elad L., Lee Albee, Irene Pankova-Kholmyansky, Sharon Epstein, Hyejung Park, Alfred H. Merrill, and Anthony H. Futerman. 2008. "Characterization of Ceramide Synthase 2 TISSUE DISTRIBUTION, SUBSTRATE SPECIFICITY, AND INHIBITION BY SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE." *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5677–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707386200>.
- Laviad, Elad L., Samuel Kelly, Alfred H. Merrill, and Anthony H. Futerman. 2012. "Modulation of Ceramide Synthase Activity via Dimerization." *Journal of Biological Chemistry* 287 (25): 21025–33.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.363580>.
- Lee, Hyun Soon. 2011. "Role of TGF- $\beta$  in Mesangial Matrix Accumulation in Chronic Progressive Glomerular Disease." *An Update on Glomerulopathies - Etiology and Pathogenesis*, September. <https://doi.org/10.5772/21988>.
- Lee, M. J., J. R. Van Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel, and T. Hla. 1998. "Sphingosine-1-Phosphate as a Ligand for the G Protein-Coupled Receptor EDG-1." *Science (New York, N.Y.)* 279 (5356): 1552–55. <https://doi.org/10.1126/science.279.5356.1552>.
- Lee, Su-Yeon, Jung Ran Kim, Yunying Hu, Raffay Khan, Su-Jung Kim, Kalyani G. Bharadwaj, Mercy M. Davidson, et al. 2012. "Cardiomyocyte Specific Deficiency of Serine Palmitoyltransferase Subunit 2 Reduces Ceramide but Leads to Cardiac Dysfunction." *Journal of Biological Chemistry* 287 (22): 18429–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.296947>.

- Lei, Lei, Liang Ping Li, Zhen Zeng, Jing Xi Mu, Xue Yang, Chao Zhou, Zhi Lan Wang, and Hu Zhang. 2018. "Value of Urinary KIM-1 and NGAL Combined with Serum Cys C for Predicting Acute Kidney Injury Secondary to Decompensated Cirrhosis." *Scientific Reports* 8 (1): 7962. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26226-6>.
- Lemaitre Rozenn N., Jensen Paul N., Hoofnagle Andrew, McKnight Barbara, Fretts Amanda M., King Irena B., Siscovick David S., et al. 2019. "Plasma Ceramides and Sphingomyelins in Relation to Heart Failure Risk." *Circulation: Heart Failure* 12 (7): e005708. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005708>.
- Leonard, Edward J, and Teizo Yoshimura. 1990. "Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)." *Immunology Today* 11 (January): 97–101. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90035-8](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90035-8).
- Lepley, Denise, Ji-Hye Paik, Timothy Hla, and Fernando Ferrer. 2005. "The G Protein–Coupled Receptor S1P2 Regulates Rho/Rho Kinase Pathway to Inhibit Tumor Cell Migration." *Cancer Research* 65 (9): 3788–95. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2311>.
- Levy, Michal, and Anthony H. Futerman. 2010a. "Mammalian Ceramide Synthases." *IUBMB Life* 62 (5): 347–56. <https://doi.org/10.1002/iub.319>.  
2010b. "Mammalian Ceramide Synthases." *IUBMB Life* 62 (5): 347–56. <https://doi.org/10.1002/iub.319>.
- Li, Jin H., Xiao R. Huang, Hong-Jian Zhu, Richard Johnson, and Hui Y. Lan. 2003. "Role of TGF- $\beta$  Signaling in Extracellular Matrix Production under High Glucose Conditions." *Kidney International* 63 (6): 2010–19. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00016.x>.
- Li, Mei-Hong, Teresa Sanchez, Anna Pappalardo, Kevin R. Lynch, Timothy Hla, and Fernando Ferrer. 2008. "Induction of Antiproliferative Connective Tissue Growth Factor Expression in Wilms' Tumor Cells by Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2." *Molecular Cancer Research* 6 (10): 1649–56. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2048>.
- Liu, H., M. Sugiura, V. E. Nava, L. C. Edsall, K. Kono, S. Poulton, S. Milstien, T. Kohama, and S. Spiegel. 2000. "Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoform." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (26): 19513–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002759200>.

- Liu, Hong, Rachelle E. Toman, Sravan K. Goparaju, Michael Maceyka, Victor E. Nava, Heidi Sankala, Shawn G. Payne, et al. 2003. "Sphingosine Kinase Type 2 Is a Putative BH3-Only Protein That Induces Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 278 (41): 40330–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304455200>.
- Liu, Xing, Kun Ren, Rong Suo, Sheng-Lin Xiong, Qing-Hai Zhang, Zhong-Cheng Mo, Zhen-Li Tang, Yue Jiang, Xiao-Shan Peng, and Guang-Hui Yi. 2016. "ApoA-I Induces S1P Release from Endothelial Cells through ABCA1 and SR-BI in a Positive Feedback Manner." *Journal of Physiology and Biochemistry*, July. <https://doi.org/10.1007/s13105-016-0504-6>.
- Liu, Y., R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C. X. Deng, J. P. Hobson, H. M. Rosenfeldt, et al. 2000. "Edg-1, the G Protein-Coupled Receptor for Sphingosine-1-Phosphate, Is Essential for Vascular Maturation." *The Journal of Clinical Investigation* 106 (8): 951–61. <https://doi.org/10.1172/JCI10905>.
- Lott, Dominik, Pierre-Eric Juif, Jasper Dingemans, and Andreas Krause. 2020. "Modelling Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Selective S1P1 Receptor Modulator Cenerimod in Healthy Subjects and Systemic Lupus Erythematosus Patients." *British Journal of Clinical Pharmacology* 86 (4): 791–800. <https://doi.org/10.1111/bcp.14182>.
- Lovisa, Sara, Valerie S. LeBleu, Björn Tampe, Hikaru Sugimoto, Komal Vadnagara, Julienne L. Carstens, Chia-Chin Wu, et al. 2015. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Induces Cell Cycle Arrest and Parenchymal Damage in Renal Fibrosis." *Nature Medicine* 21 (9): 998–1009. <https://doi.org/10.1038/nm.3902>.
- Ludwig-Portugall, Isis, Eva Bartok, Ermanila Dhana, Beatrix D. G. Evers, Michael J. Primiano, J. Perry Hall, Bernardo S. Franklin, et al. 2016. "An NLRP3-Specific Inflammasome Inhibitor Attenuates Crystal-Induced Kidney Fibrosis in Mice." *Kidney International* 90 (3): 525–39. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.035>.
- Maceyka, Michael, Kuzhuvelil B. Harikumar, Sheldon Milstien, and Sarah Spiegel. 2012. "Sphingosine-1-Phosphate Signaling and Its Role in Disease." *Trends in Cell Biology* 22 (1): 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.003>.
- MacLennan, A. J., P. R. Carney, W. J. Zhu, A. H. Chaves, J. Garcia, J. R. Grimes, K. J. Anderson, S. N. Roper, and N. Lee. 2001. "An Essential Role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) Sphingosine 1-Phosphate Receptor in Neuronal Excitability." *The European Journal of Neuroscience* 14 (2): 203–9. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01634.x>.

- Malchinkhuu, Enkhzol, Koichi Sato, Tomohiko Maehama, Chihiro Mogi, Hideaki Tomura, Shogo Ishiuchi, Yuhei Yoshimoto, Hitoshi Kurose, and Fumikazu Okajima. 2008. "S1P2 Receptors Mediate Inhibition of Glioma Cell Migration through Rho Signaling Pathways Independent of PTEN." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366 (4): 963–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.054>.
- Martini, Sebastian, Stephanie Krämer, Tanja Loof, Yingrui Wang-Rosenke, Ute Daig, Klemens Budde, Hans-H. Neumayer, and Harm Peters. 2007. "S1P Modulator FTY720 Limits Matrix Expansion in Acute Anti-Thy1 Mesangioproliferative Glomerulonephritis." *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 292 (6): F1761-1770. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00253.2006>.
- Matanes, Faris, Waleed O. Twal, and Samar M. Hammad. 2019. "Sphingolipids as Biomarkers of Disease." In *Bioactive Ceramides in Health and Disease: Intertwined Roles of Enigmatic Lipids*, edited by Johnny Stiban, 109–38. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21162-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21162-2_7).
- Matloubian, Mehrdad, Charles G. Lo, Guy Cinamon, Matthew J. Lesneski, Ying Xu, Volker Brinkmann, Maria L. Allende, Richard L. Proia, and Jason G. Cyster. 2004. "Lymphocyte Egress from Thymus and Peripheral Lymphoid Organs Is Dependent on S1P Receptor 1." *Nature* 427 (6972): 355–60. <https://doi.org/10.1038/nature02284>.
- Mayol, Katia, Vincent Biajoux, Jacqueline Marvel, Karl Balabanian, and Thierry Walzer. 2011. "Sequential Desensitization of CXCR4 and S1P5 Controls Natural Killer Cell Trafficking." *Blood* 118 (18): 4863–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-362574>.
- Meeusen, Jeffrey W., Leslie J. Donato, Sandra C. Bryant, Linnea M. Baudhuin, Peter B. Berger, and Allan S. Jaffe. 2018. "Plasma Ceramides." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 (8): 1933–39. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311199>.
- Mendoza, Alejandra, Béatrice Bréart, Willy D. Ramos-Perez, Lauren A. Pitt, Michael Gobert, Manjula Sunkara, Juan J. Lafaille, Andrew J. Morris, and Susan R. Schwab. 2012. "The Transporter Spns2 Is Required for Secretion of Lymph but Not Plasma Sphingosine-1-Phosphate." *Cell Reports* 2 (5): 1104–10. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.021>.
- Meng, Xiao-Ming, David J. Nikolic-Paterson, and Hui Yao Lan. 2016. "TGF- $\beta$ : The Master Regulator of Fibrosis." *Nature Reviews. Nephrology* 12 (6): 325–38. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>.

- Mesicek, Judith, Hyunmi Lee, Taya Feldman, Xuejun Jiang, Anastasia Skobeleva, Evgeny V. Berdyshev, Adriana Haimovitz-Friedman, Zvi Fuks, and Richard Kolesnick. 2010. "Ceramide Synthases 2, 5, and 6 Confer Distinct Roles in Radiation-Induced Apoptosis in HeLa Cells." *Cellular Signalling* 22 (9): 1300–1307. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.04.006>.
- Meyer zu Heringdorf, Dagmar, Karoly Liliom, Michael Schaefer, Kerstin Danneberg, Jonathan H. Jaggard, Gabor Tigyi, and Karl H. Jakobs. 2003. "Photolysis of Intracellular Caged Sphingosine-1-Phosphate Causes Ca<sup>2+</sup> Mobilization Independently of G-Protein-Coupled Receptors." *FEBS Letters* 554 (3): 443–49. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01219-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01219-5).
- Mishra, Jaya, Kiyoshi Mori, Qing Ma, Caitlin Kelly, Jun Yang, Mark Mitsniefes, Jonathan Barasch, and Prasad Devarajan. 2004. "Amelioration of Ischemic Acute Renal Injury by Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin." *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (12): 3073–82. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000145013.44578.45>.
- Mitra, Poulami, Carole A. Oskeritzian, Shawn G. Payne, Michael A. Beaven, Sheldon Milstien, and Sarah Spiegel. 2006. "Role of ABCC1 in Export of Sphingosine-1-Phosphate from Mast Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (44): 16394–16399.
- Mitsniefes, Mark, Philipp E. Scherer, Lisa Aronson Friedman, Ruth Gordillo, Susan Furth, Bradley A. Warady, and CKiD study group. 2014. "Ceramides and Cardiac Function in Children with Chronic Kidney Disease." *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)* 29 (3): 415–22. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2642-1>.
- Mizugishi, Kiyomi, Tadashi Yamashita, Ana Olivera, Georgina F. Miller, Sarah Spiegel, and Richard L. Proia. 2005. "Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development." *Molecular and Cellular Biology* 25 (24): 11113–21. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005>.
- Nagahashi, M., E. Y. Kim, A. Yamada, S. Ramachandran, J. C. Allegood, N. C. Hait, M. Maceyka, S. Milstien, K. Takabe, and S. Spiegel. 2013. "Spns2, a Transporter of Phosphorylated Sphingoid Bases, Regulates Their Blood and Lymph Levels, and the Lymphatic Network." *The FASEB Journal* 27 (3): 1001–11. <https://doi.org/10.1096/fj.12-219618>.
- Nagahashi, Masayuki, Kazuaki Takabe, Krista P. Terracina, Daiki Soma, Yuki Hirose, Takashi Kobayashi, Yasunobu Matsuda, and Toshifumi Wakai. 2014. "Sphingosine-1-Phosphate Transporters as Targets for Cancer Therapy." *BioMed Research International* 2014: 651727. <https://doi.org/10.1155/2014/651727>.

- Nakano, Yoshiro, Kazuko Fujitani, Joyce Kurihara, Janet Ragan, Kazue Usui-Aoki, Lori Shimoda, Tamas Lukacsovich, et al. 2001. "Mutations in the Novel Membrane Protein Spinster Interfere with Programmed Cell Death and Cause Neural Degeneration In *Drosophila Melanogaster*." *Molecular and Cellular Biology* 21 (11): 3775–88. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.11.3775-3788.2001>.
- Nava, Victor E., Emanuela Lacana', Samantha Poulton, Hong Liu, Masako Sugiura, Keita Kono, Sheldon Milstien, Takafumi Kohama, and Sarah Spiegel. 2000. "Functional Characterization of Human Sphingosine Kinase-1." *FEBS Letters* 473 (1): 81–84. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01510-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01510-6).
- Neubauer, Heidi A., Duyen H. Pham, Julia R. Zebol, Paul A.B. Moretti, Amanda L. Peterson, Tamara M. Leclercq, Huasheng Chan, et al. 2016. "An Oncogenic Role for Sphingosine Kinase 2." *Oncotarget* 7 (40): 64886–99. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11714>.
- Ni, Hai-Feng, Jun-Feng Chen, Ming-Hui Zhang, Ming-Ming Pan, Jian-Dong Zhang, Hong Liu, Ri-Ning Tang, Kun-Ling Ma, and Bi-Cheng Liu. 2013. "FTY720 Attenuates Tubulointerstitial Inflammation and Fibrosis in Subtotally Nephrectomized Rats." *Renal Failure* 35 (7): 996–1004. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2013.809006>.
- Nickolas, Thomas L., Matthew J. O'Rourke, Jun Yang, Meghan E. Sise, Pietro A. Canetta, Nicholas Barasch, Charles Buchen, et al. 2008. "Sensitivity and Specificity of a Single Emergency Department Measurement of Urinary Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin for Diagnosing Acute Kidney Injury." *Annals of Internal Medicine* 148 (11): 810–19.
- Nieuwenhuis, Barbara, Anja Lüth, Jerold Chun, Andrea Huwiler, Josef Pfeilschifter, Monika Schäfer-Korting, and Burkhard Kleuser. 2009. "Involvement of the ABC-Transporter ABCC1 and the Sphingosine 1-Phosphate Receptor Subtype S1P(3) in the Cytoprotection of Human Fibroblasts by the Glucocorticoid Dexamethasone." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 87 (6): 645–57. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0468-x>.
- Nishi, Tsuyoshi, Naoki Kobayashi, Yu Hisano, Atsuo Kawahara, and Akihito Yamaguchi. 2014. "Molecular and Physiological Functions of Sphingosine 1-Phosphate Transporters." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (5): 759–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.07.012>.

- Noda, Shinji, Shin-ichi Yoshimura, Motoshi Sawada, Takashi Naganawa, Toru Iwama, Shigeru Nakashima, and Noboru Sakai. 2001. "Role of Ceramide During Cisplatin-Induced Apoptosis in C6 Glioma Cells." *Journal of Neuro-Oncology* 52 (1): 11–21. <https://doi.org/10.1023/A:1010624823158>.
- Nowack, Rainer, Rainer Birck, and Thomas Weinreich, eds. 2009. *Dialyse und Nephrologie für Fachpersonal*. 3rd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-72323-3>.
- Nowling, Tamara K., Andrew R. Mather, Thirumagal Thiyagarajan, María José Hernández-Corbacho, Thomas W. Powers, E. Ellen Jones, Ashley J. Snider, Jim C. Oates, Richard R. Drake, and Leah J. Siskind. 2015. "Renal Glycosphingolipid Metabolism Is Dysfunctional in Lupus Nephritis." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 26 (6): 1402–13. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014050508>.
- Obeid, L. M., C. M. Linardic, L. A. Karolak, and Y. A. Hannun. 1993. "Programmed Cell Death Induced by Ceramide." *Science (New York, N.Y.)* 259 (5102): 1769–71. <https://doi.org/10.1126/science.8456305>.
- Ohmori, Tsukasa, Yutaka Yatomi, Makoto Osada, Fuminori Kazama, Toshiro Takafuta, Hitoshi Ikeda, and Yukio Ozaki. 2003. "Sphingosine 1-Phosphate Induces Contraction of Coronary Artery Smooth Muscle Cells via S1P2." *Cardiovascular Research* 58 (1): 170–77. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00260-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00260-8).
- Okamoto, Hiroyuki, Noriko Takuwa, Takehiko Yokomizo, Naotoshi Sugimoto, Soutaro Sakurada, Hiroshi Shigematsu, and Yoh Takuwa. 2000. "Inhibitory Regulation of Rac Activation, Membrane Ruffling, and Cell Migration by the G Protein-Coupled Sphingosine-1-Phosphate Receptor EDG5 but Not EDG1 or EDG3." *Molecular and Cellular Biology* 20 (24): 9247–61. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.24.9247-9261.2000>.
- Okazaki, Hitoaki, Daisuke Hirata, Takeshi Kamimura, Hidetomo Sato, Masahiro Iwamoto, Taku Yoshio, Junichi Masuyama, et al. 2002. "Effects of FTY720 in MRL-Lpr/Lpr Mice: Therapeutic Potential in Systemic Lupus Erythematosus." *The Journal of Rheumatology* 29 (4): 707–16.
- Olivera, A., T. Kohama, L. Edsall, V. Nava, O. Cuvillier, S. Poulton, and S. Spiegel. 1999. "Sphingosine Kinase Expression Increases Intracellular Sphingosine-1-Phosphate and Promotes Cell Growth and Survival." *The Journal of Cell Biology* 147 (3): 545–58. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.545>.

- Olivera, A., and S. Spiegel. 1993. "Sphingosine-1-Phosphate as Second Messenger in Cell Proliferation Induced by PDGF and FCS Mitogens." *Nature* 365 (6446): 557–60. <https://doi.org/10.1038/365557a0>.
- Osborne, Nick, Koroboshka Brand-Arzamendi, Elke A. Ober, Suk-Won Jin, Heather Verkade, Nathalia Glickman Holtzman, Deborah Yelon, and Didier Y. R. Stainier. 2008. "The Spinster Homolog, Two of Hearts, Is Required for Sphingosine 1-Phosphate Signaling in Zebrafish." *Current Biology* 18 (23): 1882–88. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.061>.
- Paik, Ji H., Sung-suk Chae, Menq-Jer Lee, Shobha Thangada, and Timothy Hla. 2001. "Sphingosine 1-Phosphate-Induced Endothelial Cell Migration Requires the Expression of EDG-1 and EDG-3 Receptors and Rho-Dependent Activation of  $\text{Av}\beta 3$ - and B1-Containing Integrins." *Journal of Biological Chemistry* 276 (15): 11830–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009422200>.
- Panzer, Ulf, Oliver M. Steinmetz, Jan-Eric Turner, Catherine Meyer-Schwesinger, Claudia von Ruffer, Tobias N. Meyer, Gunther Zahner, et al. 2009. "Resolution of Renal Inflammation: A New Role for NF-KB1 (P50) in Inflammatory Kidney Diseases." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 297 (2): F429–39. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90435.2008>.
- Paradis, Valerie, Gabriel Perlemuter, Franck Bonvoust, Delphine Dargere, Beatrice Parfait, Michel Vidaud, Marc Conti, et al. 2001. "High Glucose and Hyperinsulinemia Stimulate Connective Tissue Growth Factor Expression: A Potential Mechanism Involved in Progression to Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis." *Hepatology* 34 (4): 738–44. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.28055>.
- Parrill, Abby L., Santiago Lima, and Sarah Spiegel. 2012. "Structure of the First Sphingosine 1-Phosphate Receptor." *Science Signaling* 5 (225): pe23. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003160>.
- Patyna, Sammy, Stefan Büttner, Timon Eckes, Nicholas Obermüller, Christine Bartel, Axel Braner, Sandra Trautmann, et al. 2019. "Blood Ceramides as Novel Markers for Renal Impairment in Systemic Lupus Erythematosus." *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 144 (October): 106348. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106348>.
- Peest, Ulrike, Sven-Christian Sensken, Paul Andréani, Petra Hänel, Paul P. Van Veldhoven, and Markus H. Gräler. 2008. "S1P-Lyase Independent Clearance of Extracellular Sphingosine 1-Phosphate after Dephosphorylation and Cellular Uptake." *Journal of Cellular Biochemistry* 104 (3): 756–72. <https://doi.org/10.1002/jcb.21665>.



- Peters, Harm, Sebastian Martini, Yingrui Wang, Fujio Shimizu, Hiroshi Kawachi, Stephanie Krämer, and Hans-H. Neumayer. 2004. "Selective Lymphocyte Inhibition by FTY720 Slows the Progressive Course of Chronic Anti-Thy 1 Glomerulosclerosis." *Kidney International* 66 (4): 1434–43. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00906.x>.
- Petrache, Irina, Krzysztof Kamocki, Christophe Poirier, Yael Pewzner-Jung, Elad L. Laviad, Kelly S. Schweitzer, Mary Van Demark, Matthew J. Justice, Walter C. Hubbard, and Anthony H. Futerman. 2013. "Ceramide Synthases Expression and Role of Ceramide Synthase-2 in the Lung: Insight from Human Lung Cells and Mouse Models." *PLOS ONE* 8 (5): e62968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062968>.
- Pewzner-Jung, Yael, Hyejung Park, Elad L. Laviad, Liana C. Silva, Sujoy Lahiri, Johnny Stiban, Racheli Erez-Roman, et al. 2010. "A Critical Role for Ceramide Synthase 2 in Liver Homeostasis." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (14): 10902–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077594>.
- Prozialeck, Walter C., Joshua R. Edwards, Peter C. Lamar, Jie Liu, Vishal S. Vaidya, and Joseph V. Bonventre. 2009. "Expression of Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) in Relation to Necrosis and Apoptosis during the Early Stages of Cd-Induced Proximal Tubule Injury." *Toxicology and Applied Pharmacology, New Insights into the Mechanisms of Cadmium Toxicity*, 238 (3): 306–14. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.016>.
- Pyne, S., J. S. Long, N. T. Ktistakis, and N. J. Pyne. 2005. "Lipid Phosphate Phosphatases and Lipid Phosphate Signalling." *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 6): 1370–74. <https://doi.org/10.1042/BST20051370>.
- Rajamäki, Kristiina, Jani Lappalainen, Katariina Öörni, Elina Välimäki, Sampsa Matikainen, Petri T. Kovanen, and Kari K. Eklund. 2010. "Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation." *PLOS ONE* 5 (7): e11765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011765>.
- Rebillard, Amélie, Xavier Tekpli, Olivier Meurette, Odile Sergent, Gwenaëlle LeMoigne-Muller, Laurent Vernhet, Morgane Gorria, et al. 2007. "Cisplatin-Induced Apoptosis Involves Membrane Fluidification via Inhibition of NHE1 in Human Colon Cancer Cells." *Cancer Research* 67 (16): 7865–74. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0353>.

- Rees, Frances, Michael Doherty, Matthew J. Grainge, Peter Lanyon, and Weiya Zhang. 2017. "The Worldwide Incidence and Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review of Epidemiological Studies." *Rheumatology* 56 (11): 1945–61. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex260>.
- Ren, Shuyu, Andrea Babelova, Kristin Moreth, Cuiyan Xin, Wolfgang Eberhardt, Anke Doller, Hermann Pavenstädt, Liliana Schaefer, Josef Pfeilschifter, and Andrea Huwiler. 2009. "Transforming Growth Factor-B2 Upregulates Sphingosine Kinase-1 Activity, Which in Turn Attenuates the Fibrotic Response to TGF-B2 by Impeding CTGF Expression." *Kidney International* 76 (8): 857–67. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.297>.
- Rother, Jürgen, Gerhild van Echten, Günter Schwarzmann, and Konrad Sandhoff. 1992. "Biosynthesis of Sphingolipids: Dihydroceramide and Not Sphinganine Is Desaturated by Cultured Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189 (1): 14–20. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91518-U](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91518-U).
- Saeedi, Pouya, Inga Petersohn, Paraskevi Salpea, Belma Malanda, Suvi Karuranga, Nigel Unwin, Stephen Colagiuri, et al. 2019. "Global and Regional Diabetes Prevalence Estimates for 2019 and Projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th Edition." *Diabetes Research and Clinical Practice* 157 (November): 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>.
- Saran, Rajiv, Bruce Robinson, Kevin C. Abbott, Lawrence Y. C. Agodoa, Jennifer Bragg-Gresham, Rajesh Balkrishnan, Nicole Bhave, et al. 2019. "US Renal Data System 2018 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States." *American Journal of Kidney Diseases* 73 (3): A7–8. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.01.001>.
- Saran, Rajiv, Bruce Robinson, Kevin C. Abbott, Jennifer Bragg-Gresham, Xiaoying Chen, Debbie Gipson, Haoyu Gu, et al. 2020. "US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States." *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 75 (1S1): A6–7. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.09.003>.
- Schwalm, Stephanie, Sandra Beyer, Helena Frey, Riad Haceni, Georgios Grammatikos, Dominique Thomas, Gerd Geisslinger, Liliana Schaefer, Andrea Huwiler, and Josef Pfeilschifter. 2017. "Sphingosine Kinase-2 Deficiency Ameliorates Kidney Fibrosis by up-Regulating Smad7 in a Mouse Model of Unilateral Ureteral Obstruction." *The American Journal of Pathology*, August. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.06.017>.

- Schwalm, Stephanie, Josef Pfeilschifter, and Andrea Huwiler. 2013. "Sphingosine-1-Phosphate: A Janus-Faced Mediator of Fibrotic Diseases." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1831 (1): 239–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2012.07.022>.
- Serriere-Lanneau, Valérie, Fatima Teixeira-Clerc, Liying Li, Marlies Schippers, Willie de Wries, Boris Julien, Jeanne Tran-Van-Nhieu, et al. 2007. "The Sphingosine 1-Phosphate Receptor S1P2 Triggers Hepatic Wound Healing." *The FASEB Journal* 21 (9): 2005–13. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6889com>.
- Sharma, Sushil, A G Mathur, Sapna Pradhan, D B Singh, and Sparsh Gupta. 2011. "Fingolimod (FTY720): First Approved Oral Therapy for Multiple Sclerosis." *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* 2 (1): 49–51.  
<https://doi.org/10.4103/0976-500X.77118>.
- Shlipak, Michael G., Ronit Katz, Bryan Kestenbaum, Linda F. Fried, Anne B. Newman, David S. Siscovick, Lesley Stevens, and Mark J. Sarnak. 2009. "Rate of Kidney Function Decline in Older Adults: A Comparison Using Creatinine and Cystatin C." *American Journal of Nephrology* 30 (3): 171–78.  
<https://doi.org/10.1159/000212381>.
- Siskind, Leah J., Thomas D. Mullen, Kimberly Romero Rosales, Christopher J. Clarke, María José Hernandez-Corbacho, Aimee L. Edinger, and Lina M. Obeid. 2010. "The BCL-2 Protein BAK Is Required for Long-Chain Ceramide Generation during Apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (16): 11818–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.078121>.
- Sjöstedt, Evelina, Wen Zhong, Linn Fagerberg, Max Karlsson, Nicholas Mitsios, Csaba Adori, Per Oksvold, et al. 2020. "An Atlas of the Protein-Coding Genes in the Human, Pig, and Mouse Brain." *Science* 367 (6482).  
<https://doi.org/10.1126/science.aay5947>.
- Spiegel, Sarah, and Sheldon Milstien. 2000. "Sphingosine-1-Phosphate: Signaling inside and Out." *FEBS Letters* 476 (1–2): 55–57.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01670-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01670-7).  
2003. "Sphingosine-1-Phosphate: An Enigmatic Signalling Lipid." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (5): 397–407.  
<https://doi.org/10.1038/nrm1103>.
- Stiban, Johnny, and Meenu Perera. 2015. "Very Long Chain Ceramides Interfere with C16-Ceramide-Induced Channel Formation: A Plausible Mechanism for Regulating the Initiation of Intrinsic Apoptosis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848 (2): 561–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.018>.

- Sui, Manshu, Jin Zhou, Rujuan Xie, Xiaogang Liu, Suhong Mu, Xibei Jia, Jing Ma, and Hongchi Wu. 2012. "The Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonist FTY720 Prevents the Development of Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis." *Molecular Biology Reports* 39 (1): 389–97. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0750-1>.
- Sun, Xiao-Jing, Chen Wang, Lu-Xia Zhang, Feng Yu, Min Chen, and Ming-Hui Zhao. 2017. "Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors in Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis." *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 32 (8): 1313–22. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw427>.
- Sung, Sun Hee, Soyoun Woo, and Seung Joo Lee. 2000. "Correlation between Renal Growth Retardation and Apoptosis of Cortical Tubules in Experimentally Induced Acute Ascending Pyelonephritis in Infant Rat." *Korean J Pathol* 34 (12): 1001.
- Takabe, Kazuaki, Steven W. Paugh, Sheldon Milstien, and Sarah Spiegel. 2008. "'Inside-out' Signaling of Sphingosine-1-Phosphate: Therapeutic Targets." *Pharmacological Reviews* 60 (2): 181–95. <https://doi.org/10.1124/pr.107.07113>.
- Tashiro, Koichiro, Satoshi Tamada, Nobuyuki Kuwabara, Toshiyuki Komiya, Kaori Takekida, Toshihiro Asai, Hiroshi Iwao, et al. 2003. "Attenuation of Renal Fibrosis by Proteasome Inhibition in Rat Obstructive Nephropathy: Possible Role of Nuclear Factor KB." *International Journal of Molecular Medicine* 12 (4): 587–92. <https://doi.org/10.3892/ijmm.12.4.587>.
- Thangada Shobha, Shapiro Linda H., Silva Cynthia, Yamase Harold, Hla Timothy, and Ferrer Fernando A. 2014. "Treatment with the Immunomodulator FTY720 (Fingolimod) Significantly Reduces Renal Inflammation in Murine Unilateral Ureteral Obstruction." *Journal of Urology* 191 (5S): 1508–16. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.10.072>.
- Uhlén, Mathias, Linn Fagerberg, Björn M. Hallström, Cecilia Lindskog, Per Oksvold, Adil Mardinoglu, Åsa Sivertsson, et al. 2015. "Tissue-Based Map of the Human Proteome." *Science* 347 (6220). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>.
- Uhlén, Mathias, Max J. Karlsson, Andreas Hober, Anne-Sophie Svensson, Julia Scheffel, David Kotol, Wen Zhong, et al. 2019. "The Human Secretome." *Science Signaling* 12 (609). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaz0274>.

- Uhlen, Mathias, Max J. Karlsson, Wen Zhong, Abdellah Tebani, Christian Pou, Jaromir Mikes, Tadepally LakshmiKanth, et al. 2019. "A Genome-Wide Transcriptomic Analysis of Protein-Coding Genes in Human Blood Cells." *Science (New York, N.Y.)* 366 (6472). <https://doi.org/10.1126/science.aax9198>.
- Van Brocklyn, James R., Catherine A. Jackson, Dennis K. Pearl, Mark S. Kotur, Pamela J. Snyder, and Thomas W. Prior. 2005. "Sphingosine Kinase-1 Expression Correlates with Poor Survival of Patients with Glioblastoma Multiforme: Roles of Sphingosine Kinase Isoforms in Growth of Glioblastoma Cell Lines." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64 (8): 695–705. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000175329.59092.2c>.
- Vu, Thiet M., Ayako-Nakamura Ishizu, Juat Chin Foo, Xiu Ru Toh, Fangyu Zhang, Ding Ming Whee, Federico Torta, et al. 2017. "Mfsd2b Is Essential for the Sphingosine-1-Phosphate Export in Erythrocytes and Platelets." *Nature* advance online publication (October). <https://doi.org/10.1038/nature24053>.
- Wahab, Nadia Abdel, Katherine Harper, and Roger M. Mason. 1996. "Expression of Extracellular Matrix Molecules in Human Mesangial Cells in Response to Prolonged Hyperglycaemia." *Biochemical Journal* 316 (3): 985–92. <https://doi.org/10.1042/bj3160985>.
- Walzer, Thierry, Laura Chiossone, Julie Chaix, Andrew Calver, Claude Carozzo, Laure Garrigue-Antar, Yannick Jacques, Myriam Baratin, Elena Tomasello, and Eric Vivier. 2007. "Natural Killer Cell Trafficking *in Vivo* Requires a Dedicated Sphingosine 1-Phosphate Receptor." *Nature Immunology* 8 (12): 1337–44. <https://doi.org/10.1038/ni1523>.
- Wang, De-an, Zsolt Lorincz, Debra L. Bautista, Karoly Liliom, Gabor Tigyi, and Abby L. Parrill. 2001. "A Single Amino Acid Determines Lysophospholipid Specificity of the S1P1 (EDG1) and LPA1 (EDG2) Phospholipid Growth Factor Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 276 (52): 49213–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107301200>.
- Wang, Yan, Minghao Nie, Yanhong Lu, Rui Wang, Jin Li, Bin Yang, Mingyang Xia, Haiyang Zhang, and Xiurong Li. 2015. "Fucoidan Exerts Protective Effects against Diabetic Nephropathy Related to Spontaneous Diabetes through the NF-KB Signaling Pathway *in Vivo* and *in Vitro*." *International Journal of Molecular Medicine* 35 (4): 1067–73.
- Watson, L., K. Tullus, S. D. Marks, R. C. L. Holt, C. Pilkington, and M. W. Beresford. 2012. "Increased Serum Concentration of Sphingosine-1-Phosphate in Juvenile-Onset Systemic Lupus Erythematosus." *Journal of Clinical Immunology* 32 (5): 1019–25. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9710-3>.

- Weber, Karl T., Yao Sun, Syamal K. Bhattacharya, Robert A. Ahokas, and Ivan C. Gerling. 2013. "Myofibroblast-Mediated Mechanisms of Pathological Remodelling of the Heart." *Nature Reviews Cardiology* 10 (1): 15–26. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.158>.
- Weigert, Andreas, Susanne Schiffmann, Divya Sekar, Stephanie Ley, Heidi Menrad, Christian Werno, Sabine Grosch, Gerd Geisslinger, and Bernhard Brüne. 2009. "Sphingosine Kinase 2 Deficient Tumor Xenografts Show Impaired Growth and Fail to Polarize Macrophages towards an Anti-Inflammatory Phenotype." *International Journal of Cancer* 125 (9): 2114–21. <https://doi.org/10.1002/ijc.24594>.
- Weisheit, Christina K., Daniel R. Engel, and Christian Kurts. 2015. "Dendritic Cells and Macrophages: Sentinels in the Kidney." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 10 (10): 1841–51. <https://doi.org/10.2215/CJN.07100714>.
- Windh, Rolf T., Meng-Jer Lee, Timothy Hla, Songzhu An, Alastair J. Barr, and David R. Manning. 1999. "Differential Coupling of the Sphingosine 1-Phosphate Receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the Gi, Gq, and G12 Families of Heterotrimeric G Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 274 (39): 27351–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27351>.
- Won Park, S., M. Kim, K. M. Brown, V. D. D'Agati, and H. T. Lee. 2012. "Inhibition of Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury." *Journal of the American Society of Nephrology* 23 (2): 266–80. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011050503>.
- Wu, J. M., A. M. DiPietrantonio, and T.-C. Hsieh. 2001. "Mechanism of Fenretinide (4-HPR)-Induced Cell Death." *Apoptosis* 6 (5): 377–88. <https://doi.org/10.1023/A:1011342220621>.
- Wünsche, Christin, Alexander Koch, Roel Goldschmeding, Stephanie Schwalm, Dagmar Meyer zu Heringdorf, Andrea Huwiler, and Josef Pfeilschifter. 2015. "Transforming Growth Factor B2 (TGF-B2)-Induced Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Expression Requires Sphingosine 1-Phosphate Receptor 5 (S1P5) in Human Mesangial Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851 (5): 519–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.01.003>.

- Wynn, T. A. 2008. "Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrosis." *The Journal of Pathology* 214 (2): 199–210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>.
- Wynn, Thomas A. 2011. "Integrating Mechanisms of Pulmonary Fibrosis." *Journal of Experimental Medicine* 208 (7): 1339–50. <https://doi.org/10.1084/jem.20110551>.
- Xia, P., J. R. Gamble, L. Wang, S. M. Pitson, P. A. Moretti, B. W. Wattenberg, R. J. D'Andrea, and M. A. Vadas. 2000. "An Oncogenic Role of Sphingosine Kinase." *Current Biology: CB* 10 (23): 1527–30. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00834-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00834-4).
- Xin, Cuiyan, Shuyu Ren, Burkhardt Kleuser, Soheyla Shabahang, Wolfgang Eberhardt, Heinfried Radeke, Monika Schäfer-Korting, Josef Pfeilschifter, and Andrea Huwiler. 2004. "Sphingosine 1-Phosphate Cross-Activates the Smad Signaling Cascade and Mimics Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Cell Responses." *Journal of Biological Chemistry* 279 (34): 35255–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312091200>.
- Xu, Min, Dan Liu, Li-hong Ding, Kun-ling Ma, Min Wu, Lin-li Lv, Yi Wen, Hong Liu, Rining Tang, and Bi-cheng Liu. 2014. "FTY720 Inhibits Tubulointerstitial Inflammation in Albumin Overload-Induced Nephropathy of Rats via the Sphk1 Pathway." *Acta Pharmacologica Sinica* 35 (12): 1537–45. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.100>.
- Yamada, Akimitsu, Masayuki Nagahashi, Tomoyoshi Aoyagi, Wei-Ching Huang, Santiago Lima, Nitai C. Hait, Aparna Maiti, et al. 2018. "ABCC1-Exported Sphingosine-1-Phosphate, Produced by Sphingosine Kinase 1 Shortens Survival of Mice and Patients with Breast Cancer." *Molecular Cancer Research*, January, molcanres.0353.2017. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0353>.
- Yamanaka, Masayoshi, Daniel Shegogue, Heuping Pei, Shizhong Bu, Alicja Bielawska, Jacek Bielawski, Benjamin Pettus, Yusuf A. Hannun, Lina Obeid, and Maria Trojanowska. 2004. "Sphingosine Kinase 1 (SPHK1) Is Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$  and Mediates TIMP-1 Up-Regulation." *Journal of Biological Chemistry* 279 (52): 53994–1. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410144200>.
- Yanagawa, Y, Y Masubuchi, and K Chiba. 1998. "FTY720, a Novel Immunosuppressant, Induces Sequestration of Circulating Mature Lymphocytes by Acceleration of Lymphocyte Homing in Rats, III. Increase in Frequency of CD62L-Positive T Cells in Peyer's Patches by FTY720-Induced Lymphocyte Homing." *Immunology* 95 (4): 591–94.

- Yang, Li, Benjamin D. Humphreys, and Joseph V. Bonventre. 2011. "Pathophysiology of Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease: Maladaptive Repair." *Controversies in Acute Kidney Injury* 174: 149–55. <https://doi.org/10.1159/000329385>.
- Yang, N., N. M. Isbel, D. J. Nikolic-Paterson, Y. Li, R. Ye, R. C. Atkins, and H. Y. Lan. 1998. "Local Macrophage Proliferation in Human Glomerulonephritis." *Kidney International* 54 (1): 143–51. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00978.x>.
- Yazdani, Saleh, Ryanne S. Hijmans, Fariba Poosti, Wendy Dam, Gerjan Navis, Harry van Goor, and Jacob van den Born. 2015. "Targeting Tubulointerstitial Remodeling in Proteinuric Nephropathy in Rats." *Disease Models & Mechanisms* 8 (8): 919–30. <https://doi.org/10.1242/dmm.018580>.
- Yoo, K. H., B. A. Thornhill, M. S. Forbes, C. M. Coleman, E. S. Marcinko, L. Liaw, and R. L. Chevalier. 2006. "Osteopontin Regulates Renal Apoptosis and Interstitial Fibrosis in Neonatal Chronic Unilateral Ureteral Obstruction." *Kidney International* 70 (10): 1735–41. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000357>.
- Young, Nicholas, and James R. Van Brocklyn. 2007. "Roles of Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Receptors in Malignant Behavior of Glioma Cells. Differential Effects of S1P2 on Cell Migration and Invasiveness." *Experimental Cell Research* 313 (8): 1615–27. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.02.009>.
- Zaidan, Mohamad, Runolfur Palsson, Emilie Cornec-Le Gall, Antoine Garstka, Umberto Maggiore, Patrice Deteix, Michele Battista, et al. 2014. "Recurrent 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy: A Rare but Preventable Cause of Renal Allograft Failure." *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14 (11): 2623–32. <https://doi.org/10.1111/ajt.12926>.
- Zhang, H., N. N. Desai, A. Olivera, T. Seki, G. Brooker, and S. Spiegel. 1991. "Sphingosine-1-Phosphate, a Novel Lipid, Involved in Cellular Proliferation." *The Journal of Cell Biology* 114 (1): 155–67. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.1.155>.
- Zhou, Dong, and Youhua Liu. 2016. "Renal Fibrosis in 2015: Understanding the Mechanisms of Kidney Fibrosis." *Nature Reviews. Nephrology* 12 (2): 68–70. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.215>.
- Zhou, Huijun, Xianli Yin, Fei Bai, Wu Liu, Shaofeng Jiang, and Jinfeng Zhao. 2020. "The Role and Mechanism of S1PR5 in Colon Cancer." *Cancer Management and Research* 12 (June): 4759–75. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S239118>.



## Kooperationspartner

Die Extraktion, Bestimmung und Quantifizierung der Sphingolipide mit Hilfe von Flüssigchromatographie mit Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie-Kopplung und anschließender Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) wurden von Sandra Trautmann und Dr. Dominique Thomas aus dem Institut für Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger durchgeführt. Die Abbildungen 22, 25, 29, 31, 34 und 37 sind auf Grundlage dieser Kooperation entstanden.

Dr. Sonja Djudjaj und Prof. Dr. Peter Boor aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen haben die Gewebeproben der Patienten zur Verfügung gestellt und histologische Färbungen durchgeführt. Die Abbildungen 24 und 28 wurden im Rahmen dieser Zusammenarbeit zur Verfügung gestellt.

Die histologischen Färbungen zur Fibrose in den Mausgeweben wurden von Dr. Stefan Gauer aus der Abteilung für Nephrologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main durchgeführt. Im Rahmen dieser Kooperation wurden die Abbildungen 19 und 33 zur Verfügung gestellt.

Prof. Dr. H. J. Gröne, Leiter der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie am DKFZ in Heidelberg, stellte die Abbildung 11B zur Verfügung, welche eine semi-quantitative RT-PCR zur Bestimmung der Expression von S1P<sub>5</sub> in der humanen Niere und ihren Bestandteilen auf mRNA-Ebene zeigt.

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir eigenständig und nur mit den angegebenen Mitteln, sowie unter Beachtung der Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis, angefertigt wurde. Daten, die von Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurden, sind entsprechend ausgewiesen und zusätzlich explizit auf Seite 148 aufgelistet.

Die Daten aus dem Abschnitt 3.2 mit den Abbildungen 23, 24 ,25 , 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34 und 35B wurden bereits in dem wissenschaftlichen Artikel "*Consistent Alteration of Chain Length-Specific Ceramides in Human and Mouse Fibrotic Kidneys*" in *Biochimica Et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*; Band 1866, Ausgabe 1, Januar 2021 veröffentlicht.

Für Abbildungen, die aus externen Quellen stammen oder bereits publiziert sind, wurde die Erlaubnis zur Verwendung eingeholt.

Frankfurt am Main, den 18.01.2021

---

Timon Sebastian Eckes