

**„Regulation der Sphingosinkinase 1 und 2
und der neutralen Ceramidase
in renalen Mesangiumzellen der Ratte“**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sabine Maria Klawitter
geb. am 19.02.1979 in Pirmasens

Mainz, 2007

Inhaltsverzeichnis:	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Die Physiologie der Niere	1
1.1.1 Allgemeine Mechanismen	1
1.1.2 Die Wirbeltierniere	2
1.1.3 Die Physiologie des Mesangiums	4
1.2 Lipide und Signaltransduktion	5
1.2.1 Sphingolipidstoffwechsel	6
1.2.2 Signaltransduktion durch Sphingolipide	8
1.2.3 Die Ceramidasen	12
1.2.4 Die Sphingosinkinasen	13
1.3 Nukleotide und ihre Rezeptoren	16
1.3.1 Die Purinrezeptoren	17
1.3.1.1 Die P1-Rezeptoren	18
1.3.1.2 Die P2-Rezeptoren	19
1.4 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur	21
2.1.1 Isolierung von Mesangiumzellen aus Nierengewebe	21
2.1.2 Kultivierung von Zellen	21
2.1.2.1 Kultivierung von Mesangiumzellen	21
2.1.2.2 Kultivierung von HEK-Zellen	21
2.1.2.3 Subkultivierung von adhären wachsenden Zellen	21
2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	22
2.1.4 Stimulation von Mesangiumzellen	22
2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen	22
2.1.6 Kultivierung von Bakterienzellen	23
2.1.7 Herstellung chemokompetenter Bakterien	23
2.1.8 Transformation von Bakterien	24
2.2 Bestimmung zellulärer Parameter	24
2.2.1 Nachweis der Migrationsfähigkeit von Säugerzellen mit Hilfe des Transwell-Tests	24

2.2.2	Nachweis der Proliferation von Säugerzellen mittels [³ H]-Thymidin-Einbau	25
2.2.3	Nachweis der Enzymaktivität	25
2.2.3.1	<i>Sphingosinkinase-Aktivitätsassay</i>	25
2.2.3.2	<i>Neutrale Ceramidase-Aktivitätsassay</i>	26
2.2.4	Quantitative Ceramid-, Sphingosin- und Sphingosin-1-Phosphat-Bestimmung (LC/MS/MS)	26
2.3	Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1	RNA-Techniken	27
2.3.1.1	<i>RNA-Isolierung</i>	27
2.3.1.2	<i>Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA</i>	27
2.3.1.3	<i>Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)</i>	28
2.3.1.4	<i>Quantitative Real-Time PCR (Taqman)</i>	28
2.3.2	DNA-Techniken	29
2.3.2.1	<i>DNA-Präparation</i>	29
2.3.2.2	<i>Präparation von Plasmid-DNA</i>	29
2.3.2.3	<i>Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA</i>	29
2.3.2.4	<i>DNA-Fällung</i>	29
2.3.2.5	<i>DNA-Restriktion</i>	29
2.3.2.6	<i>DNA-Standardgelelektrophorese</i>	30
2.3.2.7	<i>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</i>	30
2.3.2.8	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	30
2.3.2.9	<i>Aufreinigung von PCR-Produkten</i>	31
2.3.2.10	<i>Klonierung von DNA-Fragmenten</i>	31
2.3.2.11	<i>DNA-Sequenzierung</i>	31
	<u>2.3.2.11.1 Sequenzierung von Plasmidvektoren und PCR-Produkten</u>	31
	<u>2.3.2.11.2 Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten</u>	32
2.4	Proteinbiochemische Methoden	33
2.4.1	Herstellung von Proteinextrakten	33
2.4.1.1	<i>Gesamtzellextrakte (WCE)</i>	33
2.4.1.2	<i>Zytoplasma- und Kernextrakte</i>	33
2.4.2	Kolorimetrische Proteinbestimmung	33
2.4.3	Proteinfällung	34
2.4.3.1	<i>Trichloressigsäure-Präzipitation (TCA-Präzipitation)</i>	34
2.4.3.2	<i>Immunopräzipitation</i>	34
2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.4.5	Elektro-Transfer	35

2.4.6	Immunochemischer Nachweis von Proteinen (Westernblot-Analyse)	35
2.5	<i>Bestimmung der Promotoraktivität</i>	35
2.6	<i>Statistische Analyse</i>	36
2.7	<i>Materialien</i>	37
2.7.1	Chemikalien	37
2.7.2	Zellkulturreagenzien	40
2.7.3	Antikörper	41
2.7.4	Enzyme	41
2.7.5	Plasmidvektoren	42
2.7.6	Zelllinien	42
2.7.7	Kits / Assays / Transfektionsreagenzien / Standards	42
2.7.8	Bakterienstämme	43
2.7.9	Verbrauchsmaterialien	43
2.7.10	Oligonukleotide für die PCR	43
2.7.11	siRNA-Oligonukleotide	45
2.7.12	Taqman-Sonden	46
2.7.13	Puffer und Lösungen	46
3.	<i>Ergebnisse</i>	49
3.1	<i>Effekte der extrazellulär applizierten Nukleotide auf die Sphingosinkinasen und die neutrale Ceramidase</i>	49
3.1.1	Wirkung von ATP auf die Aktivität der Sphingosinkinase 1	52
3.1.2	Wirkung von UTP auf die Aktivität der Sphingosinkinase 1	53
3.1.3	Regulation der durch ATP und UTP induzierten rSK 1-Aktivität	56
3.2	<i>Effekte der extrazellulär applizierten Nukleotide ATP und UTP auf die Expression der Sphingosinkinase 1</i>	59
3.2.1	Effekt von ATP auf die Expression der Sphingosinkinase 1	59
3.2.2	Effekt von UTP auf die Expression der Sphingosinkinase 1	61
3.3	<i>Beteiligung der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase an Zellantworten von Mesangiumzellen</i>	64
3.3.1	Rolle von Nukleotiden, Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei der Migration von Mesangiumzellen	64
3.3.2	Rolle von Nukleotiden, Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei der Proliferation von Mesangiumzellen	73

4. Diskussion	77
4.1 Regulation der Aktivität der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase durch extrazelluläre Nukleotide	78
4.2 Funktion der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei der Migration von renalen Mesangiumzellen	83
4.3 Funktion der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei der Proliferation von renalen Mesangiumzellen	88
4.4 Rolle der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei Krankheitsprozessen	91
4.5 Ausblick	99
5. Zusammenfassung	100
5.1 Zusammenfassung	100
5.2 Summary	102
6. Literaturverzeichnis	104
7. Anhang	129
7.1 Abbildungsverzeichnis	129
7.2 Tabellenverzeichnis	130
Erklärung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
A. bidest.	Aqua bidestillata
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare (bei mRNA: Basen)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CDS	„coding sequence“
Ci	Curie
cm	Zentimeter
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
DNA	„desoxyribonucleic acid“
dNTP	2'-Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ECL	„enhanced chemoluminescence“
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	„extracellular signal regulated kinase“
EST	„expressed sequence tag“
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HEK	humane embryonale Nierenzellen
IL-1 β	Interleukin 1 β
IP ₃	Inositol-1, 4, 5,-triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	Joule
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton

Abkürzungsverzeichnis

M	Mol
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
mA	Milli-Ampère
mg	Milligramm
min	Minuten
mM	Millimol
ml	Milliliter
mRNA	“messenger RNA”
MS	Massenspektrometrie
NCer	Neutrale Ceramidase
OD	optische Dichte
ORF	“open reading frame”
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	“phosphate buffered saline”
PC	Phosphocholin
PCR	„polymerase chain reaction“
PI	Phosphoinositol
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidyl- 4, 5- biphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
rSAH2	neutrale Ceramidase der Ratte
RNA	„ribonucleic acid“
rNCer	neutrale Ceramidase der Ratte
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rSPHK/rSK	Sphingosinkinase der Ratte
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„reverse transcriptase polymerase chain reaction“
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
sec	Sekunde
SK	Sphingosinkinase
SM	Sphingomyelin
Std.	Stunde
TLC	Dünnschichtchromatographie

Abkürzungsverzeichnis

TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
U	„unit“ (Enzymeinheit)
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslierter Bereich
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
Vol.	Volumen
v/v	„volume/volume“ (Volumen/Volumen)
w/v	„weight/volume“ (Gewicht/Volumen)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1- und 3- Buchstabencode der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

1.1 Physiologie der Niere

1.1.1 Allgemeine Mechanismen

Der Stoffwechsel produziert eine Vielzahl giftiger Nebenprodukte. Die problematischsten stellen dabei die stickstoffhaltigen Metabolite des Proteinstoffwechsels dar. Das primäre Abbauprodukt aller katabolen Stoffwechselreaktionen stellt das giftige Ammoniak dar. Die direkte Exkretion ist zwar bioenergetisch effizient, da keine metabolischen Kosten anfallen, dennoch wandeln viele Tiere Ammoniak in Verbindungen wie Harnstoff oder Harnsäure um, da diese Verbindungen wesentlich ungiftiger sind. Je nach Art des Exkretes unterscheidet man dabei ammoniotelische (ausschließlich Wasserbewohner), ureotelische (Harnstoffbildner; adulte Amphibien, Säugetiere) und uricotelische (Harnsäurebildner; Reptilien, Vögel) Tiere. Auch die Art der Exkretion variiert in Anpassung an die unterschiedlichen Lebensräume. Gemeinsam ist allen Exkretionsmechanismen die Bildung eines so genannten Primärharns entweder durch Druckfiltration (z.B. bei Plathelminthen, Molusken, Crustaceen, Vertebraten) oder Sekretion (z.B. bei Insekten). Die Bildung des Endharns (Urin) erfolgt in einem zweiten Schritt durch Reabsorption aller verwertbaren Substanzen aus dem Primärharn. Landtiere gewinnen dabei neben Ionen auch den größten Teil des Wassers zurück. Während bei der Sekretion und der Reabsorption substanzspezifische Transportmechanismen eine wichtige Rolle spielen, ist bei der Druckfiltration allein die Molekülgröße entscheidend. Entsprechend finden sich in den verschiedenen Tierstämmen unterschiedliche Filtrationsorgane, die die oben beschriebenen Aufgaben wahrnehmen. Man unterscheidet zwischen Protonephridien, Metanephridien, Malpighi-Gefäßen und den Nephronen. Protonephridien findet man bei Tieren ohne Coelom (z.B. Plathelminthen, Nemertinen, Anneliden- und Molluskenlarven). Es handelt sich dabei um vielfach verzweigte Kanäle ausgehend von einer Terminalzelle (Cyrtocyte), die über einen Kranz fingerförmiger Membranausstülpungen verfügt. In dieser Reusenaugezelle schlägt ein Cilienbündel, das einen nach außen gerichteten Flüssigkeitsstrom erzeugt. Der Unterdruck führt zur Filtration von Gewebsflüssigkeit an dem Reusenapparat der Terminalzelle. Im anschließenden Tubulus wird dieser Primärharn durch Reabsorption modifiziert. Metanephridien (oder auch Nephridien) findet man bei Tieren mit Coelom (z.B. Anneliden, einigen Mollusken). Die Tubuli beginnen hier mit einem zum Coelom offenen Wimperntrichter, dem Nephrostom. Der Primärharn wird hier durch Filtration an den mit Blutgefäßen versorgten Coelomwänden gebildet und vom Nephrostom eingestrudelt. Im nachfolgenden Tubulus wird dann durch Sekretion und Reabsorption (bei Anneliden) der Sekundärharn gebildet. Malpighi-Gefäße findet man bei den Landarthropoden. Es handelt sich um dünne Schläuche, die an der Grenze von Mittel- und Enddarm in den

Einleitung

Verdauungstrakt einmünden. Sie dienen sowohl der Exkretion als auch der Osmoregulation. Die tubulären Gefäße enden blind in der Hämolymphe und bilden den Primärharn durch Sekretion. Die Rückresorption von Ionen, verwertbaren organischen Substanzen und Wasser erfolgt im Enddarm. Die Harnsäure wird als trockene Substanz ins Freie abgegeben.

1.1.2 Die Wirbeltiere

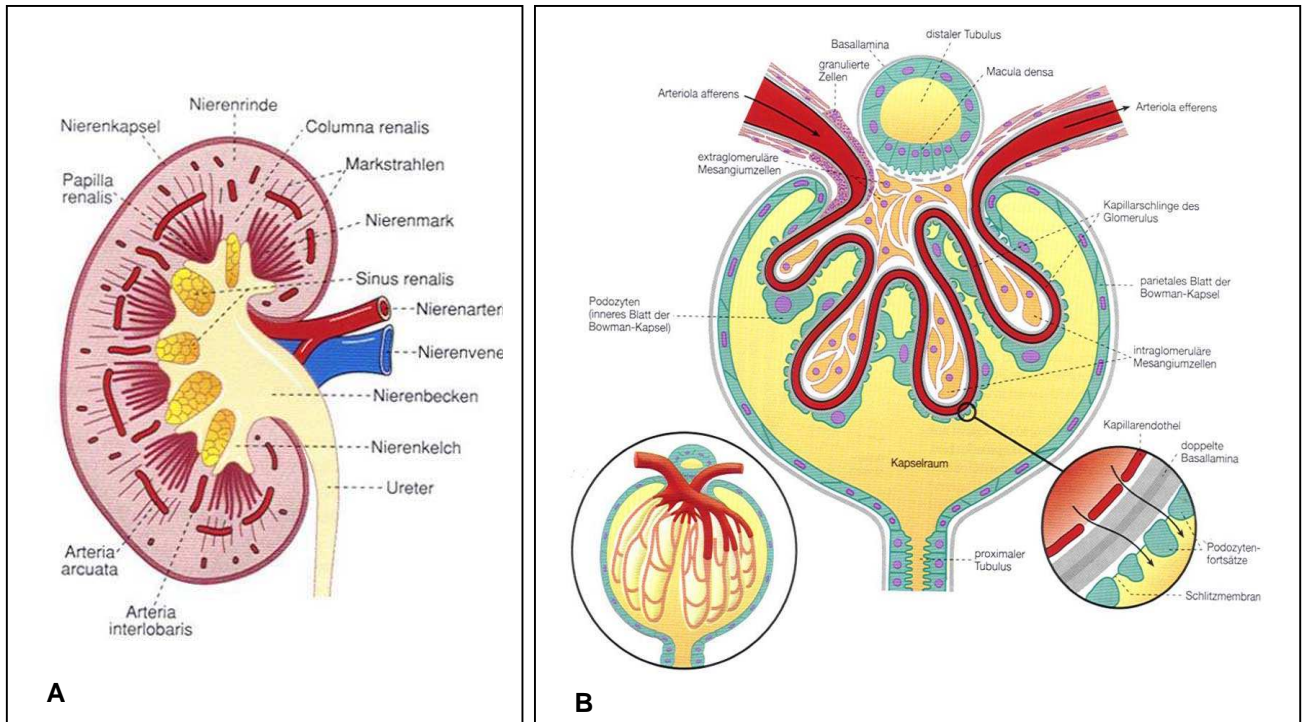


Abb. 1: Niere des Menschen und Nierenkörperchen (Malpighi-Körperchen).

Abb. 1A zeigt im Längsschnitt eine schematische Darstellung der menschlichen Niere. Abb. 1B zeigt einen Glomerulus in schematischer Darstellung. Links unten abgebildet sind die Kapillarschlingen des Glomerulus.

Die anatomischen und funktionellen Einheiten der Wirbeltiere bezeichnet man als Nephrene. Beim Menschen sind die Nieren paarige Organe von ca. 10 cm Länge, unterteilt in zwei Regionen, die äußere Rindenschicht (Cortex) und die innere Markschiicht (Medulla). Die Nieren erhalten mit jedem Herzschlag 20% des gesamten Blutvolumens über die Nierenarterien und enthalten jeweils ca. 1-2 Millionen Nephrene. In der menschlichen Niere sind 80% der Nephrene cortikale Nephrene und lediglich rund 20% juxtamedulläre Nephrene. Jedes Nephron wird von einer afferenten Arteriole versorgt. Diese Kapillaren vereinigen sich nach Verlassen des Glomerulus unter Bildung einer efferenten Arteriole wieder, um schließlich erneut in ein peritubuläres Kapillarnetz, das die proximalen und distalen Tubuli umgibt, aufzufächern. Bei juxtamedullären Nephronen bilden die Kapillaren die Vasa recta, das Kapillarsystem der Henle-Schleife. Das einzelne Nephron besteht aus einem einzelnen langen Tubulus (Rückresorption und Sekretion) und dem Malpighi-Körperchen (Ultrafiltration und Primärharnbildung). Dieses besteht aus dem Glomerulus, der

Bowman-Kapsel und dem Mesangium. Die Kapsel gliedert sich in ein inneres (viszerales) und ein äußeres (parietales) Blatt. Das parietale Blatt bildet die äußere Begrenzung der Malpighi-Körperchen, das viszerale Blatt liegt dem Glomerulus auf. Im Malpighi-Körperchen findet eine Ultrafiltration des Blutes statt. Der Blutdruck presst Wasser, Harnstoff, Salze und niedermolekulare Verbindungen aus dem Blut in das Lumen der Bowman-Kapsel. Als Ultrafilter dienen dabei spezialisierte Epithelzellen, die Podocyten. Der Ultrafilter ist unselektiv und lässt alle Moleküle bis zu einer Größe von ca. 50 kDa passieren. Prinzipiell werden alle Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 68 kDa (= Albumin) normalerweise zurückgehalten. Entsprechend ist der Primärharn isoton zum Blutplasma. Eine der wichtigsten Funktionen des proximalen Tubulus ist die Reabsorption von Wasser und NaCl. Darüber hinaus werden Nährstoffe wie Aminosäuren und Glucose aktiv aus dem Tubuluslumen in die interstitielle Flüssigkeit transportiert, von wo aus sie in die peritubulären Blutkapillaren diffundieren. Giftstoffe und von der Leber prozessierte Schadstoffe werden vom Epithel des proximalen Tubulus in das Ultrafiltrat abgegeben. Die Arbeitsweise der Henle-Schleife bezeichnet man als Gegenstrom-Multiplikationsprinzip: das Filtrat verliert im absteigenden Ast (Wasserpermeabel, impermeabel für Salze) osmotisch Wasser und erreicht am Wendepunkt der Schleife die höchste Osmolarität. Dies führt zu einer maximalen Diffusionsrate von Salzen im nur für Salze permeablen aufsteigenden Ast, die zur Aufrechterhaltung der hohen Osmolarität der inneren Markschicht genutzt wird. Der Abbau dieses Gradienten wird durch ein gleichartiges Gegenstromsystem der *Vasa recta* verhindert. Das Blut wird hierbei in gegenläufiger Richtung durch den Gradienten geführt und verliert dabei auf dem Weg in die innere Markzone Wasser und nimmt Salze auf. Im aufsteigenden Gefäß kehrt sich dieser Prozess einfach um. Dadurch bleibt der osmotische Gradient erhalten. Im distalen Tubulus wird HCO_3^- reabsorbiert, ebenso NaCl. Gleichzeitig ist dieses Epithel auch an der Kontrolle des K^+/Na^+ -Haushaltes beteiligt. Das Sammelrohr führt das Filtrat nochmals in das Nierenbecken und entzieht ihm osmotisch Wasser. In der inneren Markschicht ist das Epithel des Sammelrohres permeabel für Harnstoff, so dass ein Teil des im Filtrat enthaltenen Harnstoffs in die interstitielle Flüssigkeit diffundieren kann und so zu deren hoher Osmolarität beiträgt. Der auf diese Weise gewonnene hypertonische Harn wird durch die Harnleiter (Urether) in die Harnblase weitergeleitet und von dort über die Harnröhre (Urethra) ausgeschieden. Die Niere erfüllt somit viele wichtige Funktionen: Sie kontrolliert den Wasser- und Salzhaushalt, überwacht und steuert den Säure-Basen-Haushalt, dient der Ausscheidung von Endprodukten des Purin- und Stickstoffstoffwechsels oder von Fremdstoffen, hat Funktionen im Stoffwechsel (z.B. Argininsynthese), bildet verschiedene Hormone und Gewebefaktoren (z.B. Erythropoetin, Angiotensin II, Calcitriol, Prostaglandine) und kontrolliert den arteriellen Blutdruck.

1.1.3 Physiologie des Mesangiums

Ein Glomerulus besteht aus vier verschiedenen Zelltypen. Man unterscheidet zwischen den Endothelzellen, die die Kapillaren des Glomerulus auskleiden, den perizytenähnlichen Mesangiumzellen, die die Räume zwischen den Kapillaren auskleiden, den Podocyten (viszerale Epithelzellen) und den parietalen Epithelzellen, die die innere Oberfläche der Bowman-Kapsel auskleiden (Remuzzi und Bertani, 1998). Die Mesangiumzellen selbst sind umgeben von einer speziellen Matrix, die Mikrofibrillen, Kollagen vom Typ IV, V und VI, Proteoglykane und Fibronectin enthält. Das Mesangium dient als Stabilisator der Kapillarwände.

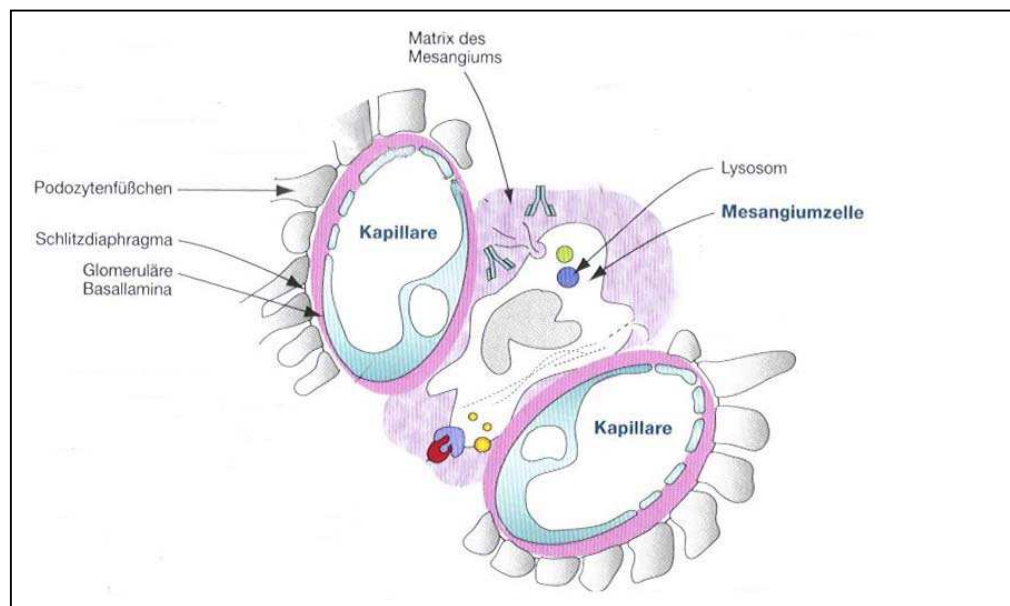


Abb. 2: Funktion und Struktur des Mesangiums (modifiziert nach Kierszenbaum (2002))

Die Abbildung zeigt die Position der Mesangiumzellen innerhalb der eigenen Matrix zwischen den Kapillaren und den Podocyten des Glomerulus.

Die Mesangiumzellen selbst sind perizytenähnliche Zellen, die kontraktile sind und durch ihren variablen Kontraktionszustand, gesteuert über Angiotensin II und andere vasoaktive Substanzen, den Blutfluss der glomerulären Kapillaren modifizieren. Daneben können sie Immunglobuline phagozytieren, die sich in der Basallamina des Glomerulus verfangen haben und sind am Umsatz der glomerulären Basallamina durch Aufnahme der abzubauenen Komponenten beteiligt. Mesangiumzellen spielen ebenso eine bedeutende Rolle bei einer Reihe von glomerulären Erkrankungen (Sterzel et al., 1992, Floege et al., 1994, Pfeilschifter, 1994, Schlöndorff, 1996). Unter entzündlichen Bedingungen im Glomerulus interagieren die Mesangiumzellen aktiv mit einwandernden Immunzellen wie Neutrophilen und Makrophagen. Die von den Immunzellen sezernierten Zytokine, wie IL-1 und TNF-alpha, aktivieren die Mesangiumzellen, so dass sie in die Lage versetzt werden, selbst bioaktive Moleküle wie Eikosanoide, NO, Wachstumsfaktoren oder entzündlich wirkende Zytokine zu produzieren

und vermehrt extrazelluläre Matrix zu bilden. Darüber hinaus führt die Aktivierung der Mesangiumzellen unter diesen Bedingungen auch zu einer verstärkten Proliferation (Sterzel et al., 1992, Floege et al., 1994, Pfeilschifter, 1994, Schlöndorff, 1996). Bei chronisch-entzündlichen Bedingungen in der Niere, wie Glomerulonephritiden, führt dies zu einer irreversiblen Veränderung der Glomerulusstruktur in Form einer Glomerulosklerose, die dann zu einem Nierenversagen führen kann (Pfeilschifter et al., 1993, Pfeilschifter, 1994). Neben den glomerulären Mesangiumzellen findet man noch die extraglomerulären. Diese sind über Gap junctions untereinander und mit den glomerulären Mesangiumzellen verbunden. Darüber hinaus stehen diese Zellen auch mit granulierten Zellen und den glatten Muskelzellen der Arteriola afferens und efferens in Verbindung. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise perzipieren sie den Natriumgehalt des distalen Tubulus.

1.2 Lipide und Signaltransduktion

Lange Zeit galten Lipide lediglich als wichtige strukturelle Bestandteile von Zellmembranen, die durch ihre Fähigkeit, Doppelmembranen aufzubauen eine Barriere zwischen dem extrazellulären und dem intrazellulären Raum bilden konnten. Bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts zeigte sich jedoch, dass Lipide darüber hinaus auch eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung besitzen. Die durch Agonisten induzierte Hydrolyse von Membranlipiden führt zur Bildung von bioaktiven Molekülen, die verschiedene Signalkaskaden innerhalb der Zelle zu beeinflussen vermögen. Die Entdeckung des Phosphatidylinositol-Zyklus war der erste Beweis für eine wichtige Rolle der Lipide auch in der Signaltransduktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) durch die Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PLC) zur Freisetzung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) führt (Berridge, 1984; Rhee et al., 1989). IP_3 bindet an intrazelluläre Rezeptoren an der Plasmamembran und an der Membran des endoplasmatischen Retikulums und führt zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Berridge, 1987; Putney und Ribeiro, 2000). Im Gegensatz dazu bindet DAG an die Proteinkinase C und aktiviert sie auf diesem Wege (Nishizuka, 1995). Dies wiederum führt zur Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden. Weitergehende Studien konnten zeigen, dass die Bildung von Phosphatidylsäure (PA) entweder durch Hydrolyse von Phosphatidylcholin durch die Phospholipase D (PLD) (Exton, 1997) oder durch Phosphorylierung von DAG durch eine Diacylglycerinkinase (Topham und Prescott, 1999) Signalkaskaden initiieren kann. Auch die durch die Aktivierung von Phospholipasen vom Typ A_2 (PLA_2) freigesetzte Arachidonsäure konnte als wichtiges Signalmolekül identifiziert werden. Darüber hinaus dient diese Säure auch als Vorstufe für die Synthese einer weiteren wichtigen Gruppe von bioaktiven Substanzen, den Eikosanoiden (Piomelli, 1993). Eine ebenso wichtige Rolle spielt Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat

(PIP₃), das von der sogenannten Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) gebildet wird und in der Lage ist, die Akt/Proteinkinase B (PKB), die Phosphoinositid-abhängige Kinase (PDK) und die Proteinkinasen C ϵ und ζ zu aktivieren (Leevers et al., 1999, Vanhaesebroeck und Alessi, 2000, Rameh et al., 1999). Neben den Glycerophospholipiden konnte in den letzten Jahren eine weitere Klasse von Lipiden als wichtige Signalmoleküle identifiziert werden, die Klasse der Sphingolipide (Okazaki et al., 1989, Hannun, 1994, Huwiler et al., 2000). Erstmals isoliert wurden Vertreter dieser Klasse von Tudichum 1884 durch fraktionelle Kristallisation von ethanolischen Gehirnextrakten. Heute sind über 300 verschiedene Sphingolipide bekannt (Hakamori, 1981, Hannun und Bell, 1989, Wiegandt, 1985). Man findet sie in allen eukaryotischen Zellen, angereichert vor allem in der Plasmamembran, aber auch in den Membranen des Golgi-Apparates und in den Lysosomen (Merrill et al., 1997, Huwiler et al., 2000). Bereits 1986 konnte nachgewiesen werden, dass das Sphingolipid Sphingosin die Proteinkinasen C direkt hemmen kann (Hannun et al., 1986). Im nachfolgenden wurden eine Reihe weiterer Sphingolipide als Signalmoleküle beschrieben (Okazaki et al., 1989, Hannun, 1994, Huwiler et al., 2000). So kann Sphingosin-1-Phosphat die Migration und Proliferation zahlreicher Zelltypen, wie z.B. von glatten Gefäßmuskelzellen, Lymphozyten und Blutplättchen, beeinflussen (Boguslawski et al., 2000, Mandala et al., 2002, English et al., 1999). Darüber hinaus spielt dieses Sphingolipid über die Kopplung an die entsprechenden S1P-Rezeptoren (ehemals Edg-Rezeptoren) eine wichtige Rolle bei der Regulation von Angiogenese, Embryogenese, Herzentwicklung und auch im Immunsystem (Ancellin et al., 2002, Boguslawski et al., 2000, Freeman und Gurdon, 2002, Brand, 2003, Cinque et al., 2003). Im Gegensatz dazu spielt Ceramid eine zentrale Rolle in der zellulären Stressantwort, einschließlich der Regulation von Apoptose, Wachstumsstopp und Differenzierung (Wiesner et al., 1997, Huwiler et al., 1997, Riboni et al., 1995, 1997, Perry und Hannun, 1998).

1.2.1 Sphingolipidstoffwechsel

Alle Sphingolipide sind gekennzeichnet durch die Anwesenheit eines Sphingosinrückgrates. In den Zellen von Säugetieren handelt es sich dabei in der Regel um Sphingosin, während in Hefe- und Pflanzenzellen Phytosphingosin häufiger zu finden ist. Die Biosynthese von Sphingolipiden beginnt immer mit der Kondensation von Palmitoyl-CoA und Serin. Dabei entsteht Dihydrosphingarin (=3-Ketosphingosin), das durch die NADPH-abhängige Reduktase reduziert wird zu Dihydrosphingosin. Durch die Addition eines langkettigen Acyl-CoA-Restes entsteht zunächst Dihydroceramid, das dann direkt durch die Einführung einer Doppelbindung zwischen C4 und C5 des Lipidrückgrates in Ceramid umgewandelt wird (Merrill und Jones, 1990). Ceramid selbst ist der „Grundbaustein“ oder Vorläufer aller Sphingolipide und kann durch Einführung unterschiedlicher funktioneller Gruppen noch wei-

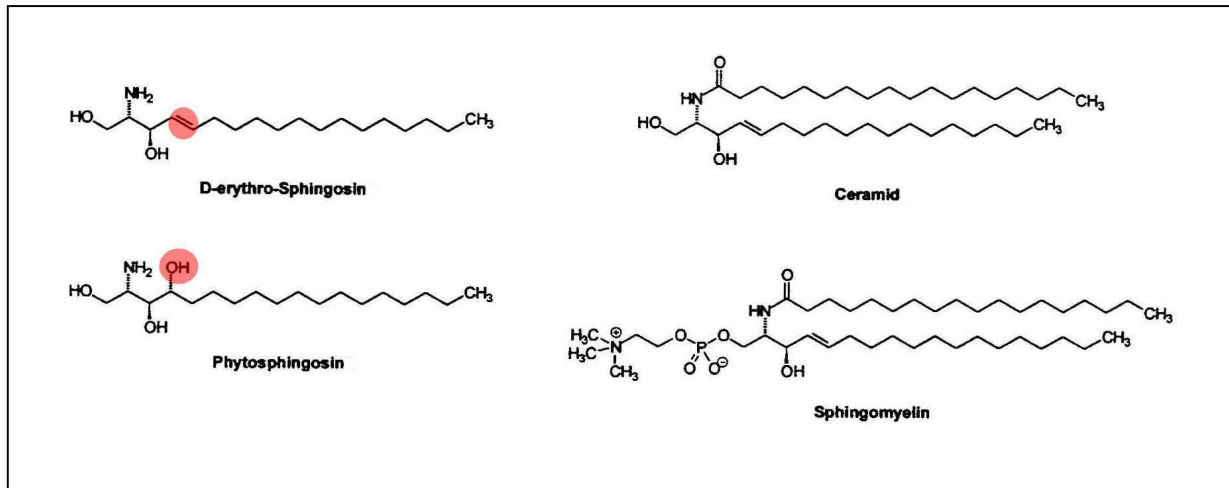


Abb. 3: Chemische Struktur einiger ausgewählter Sphingolipide

Dargestellt sind vier wichtige Vertreter der Klasse der Sphingolipide. Rot unterlegt sind die Doppelbindung in D-erythro-Sphingosin und die Hydroxylgruppe in Phytosphingosin, die den einzigen Unterschied zwischen diesen beiden Sphingolipiden darstellen.

ter modifiziert werden, was die Bildung komplexer Sphingolipide ermöglicht (Merrill und Jones, 1990). Der „einfachste“ Vertreter dieser komplexen Sphingolipide ist Ceramid-1-Phosphat, das durch Einführung eines Phosphatrestes am C1-Atom des Ceramids von der Ceramidkinase gebildet werden kann. Für die Bildung von Cerebrosiden (Glucosylceramid, Galactosylceramid) wird Glucose oder Galactose durch eine β -glykosidische Bindung an die terminale Hydroxylgruppe substituiert. Die Addition von Sulfatresten an Galactosylceramid wiederum liefert die Sulfatide.

Für die Bildung von Glycosphingolipiden werden zwei, drei oder vier Glucoseresste mit dem Ceramid verknüpft. Ganglioside dagegen bilden eine Unterklasse der Glycosphingolipide und sind durch die Anwesenheit von Sialinsäure (N-Acetylneuraminat oder N-Glykolyneuraminat) gekennzeichnet (Huwiler et al., 2000). Die Substitution der terminalen Hydroxylgruppe von Ceramid durch Phosphorylcholin durch die Aktivität einer Sphingomyelinsynthase führt zur Bildung von Sphingomyelin (Merrill und Jones, 1990). Daneben findet man in den Zellen auch Lysosphingolipide und N-deacetylierte Derivate (z.B. 1-Galactosylsphingosin, Glucosylsphingosin, Sphingosin-1-Phosphat, Sphingosin und Lysosphingomyelin). Allen diesen Sphingolipiden ist gemeinsam, dass sie nur in sehr geringen Konzentrationen in der Zelle vorliegen, aber dennoch wichtige Signalfunktionen ausüben (z.B. Sphingosin-1-Phosphat) oder aber durch ihre lytischen und Membranen destabilisierenden Effekte die Zellfunktion beeinflussen (Iwabuchi et al., 2000).

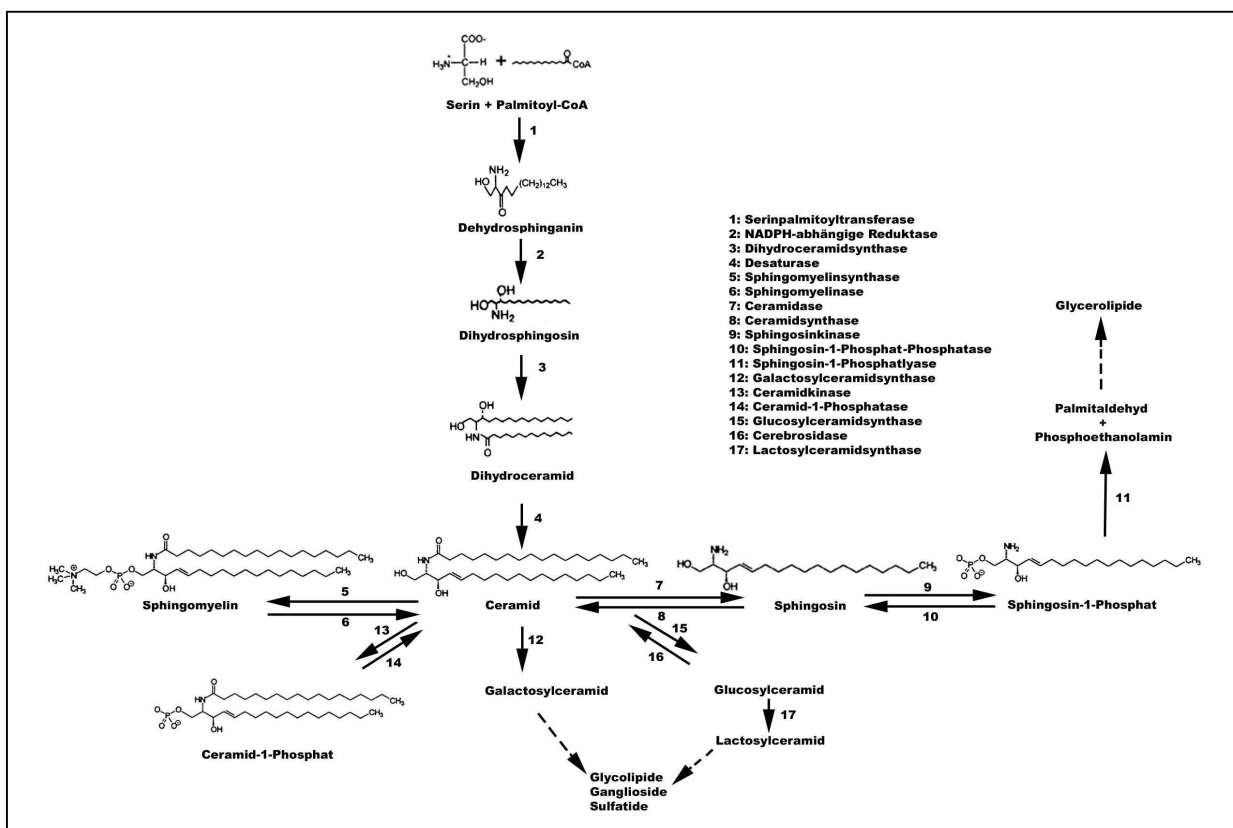


Abb. 4: Biosynthesewege der Sphingolipide

Die Abbildung gibt einen Überblick über die Biosynthesewege der Sphingolipide. Besonders zu bemerken ist die zentrale Rolle von Ceramid innerhalb des Biosyntheseweges. Von Ceramid ausgehend können zahlreiche wichtige Sphingolipide synthetisiert werden, so z.B. auch der wichtige Botenstoff Sphingosin-1-Phosphat, der zusammen mit Ceramid bei der Regulation zahlreicher zellulärer Antworten eine wichtige Rolle spielt.

1.2.2 Signaltransduktion durch Sphingolipide

Die Signaltransduktion durch Sphingolipide ist ein ubiquitär verbreitetes System, das von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist (Ballou et al., 1996, Hannun, 1996, Spiegel et al., 1996, Pena et al., 1997, Renault et al., 2002, Coursol et al., 2003). Die Entdeckung, dass Sphingolipide als bioaktive Moleküle wirksam sein können, führte zu der Fragestellung, welche Rolle sie in den zellulären Antworten spielen. Sphingomyelin findet sich in den Plasmamembranen nahezu jeder eukaryotischen Zelle. Studien konnten zeigen, dass bis zu 50% des Sphingomyelins in einer Zelle in den Plasmamembranen fixiert vorliegt (Koval und Pagano, 1991). Der größte Teil dieses Sphingomyelins findet sich in der Außenseite der Membran. Eine kleinere Fraktion befindet sich auf der Innenseite der Membran und kann nach entsprechender Stimulation der Zelle durch die neutrale Sphingomyelinase zu Ceramid umgesetzt werden (Linardic und Hannun, 1994). Damit gehören die Sphingomyelinasen zu den wichtigen Regulatoren für die Signalwege, die Ceramid als Signalmolekül nutzen. So

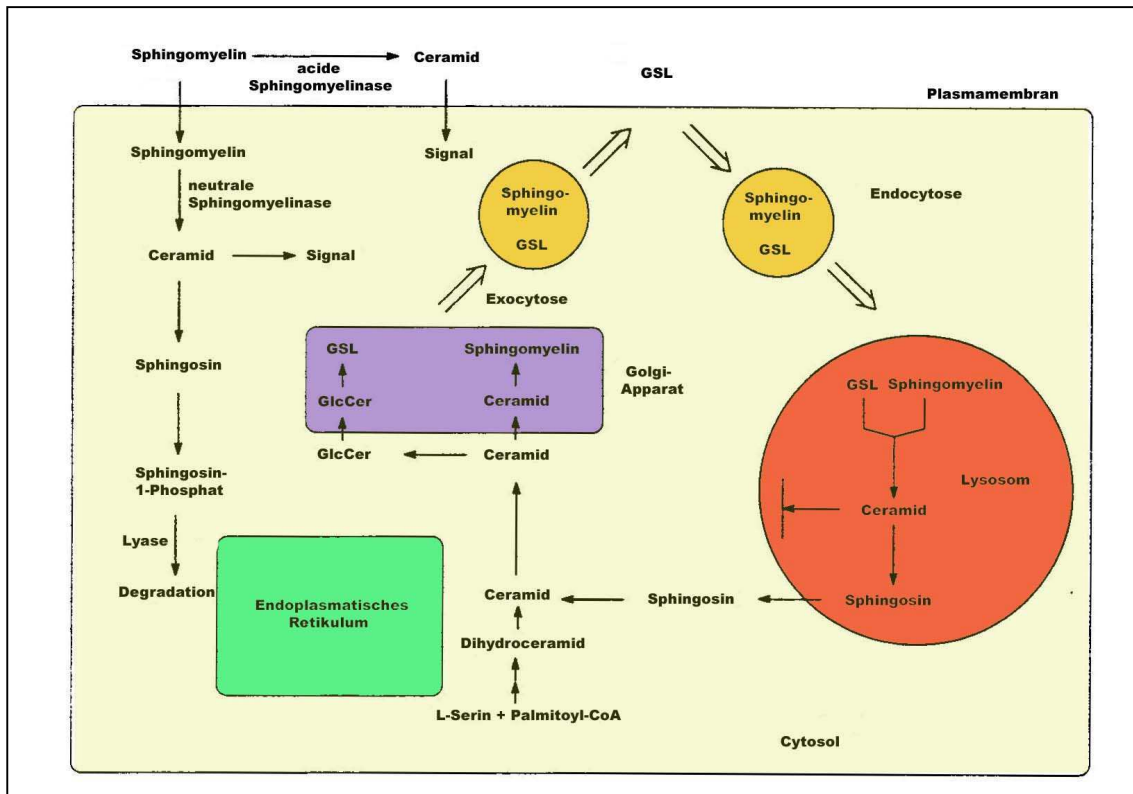


Abb. 5: Zelluläre Topologie der Biosynthese, Degradation und der Signaltransduktion der Sphingolipide (modifiziert nach Huwiler et al., 2000; GSL: Glucosphingolipide; GlcCer: Glucosylceramid)

konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von Sphingomyelin durch eine Reihe unterschiedlichster Stimuli, wie z.B. proinflammatorische Zytokine (Interleukin-1 β , Tumornekrosefaktor α , Interferon γ), Chemotherapeutika, UV-Licht, Bestrahlung und NO induziert werden (Okazaki et al., 1996, Hannun, 1996, Spiegel et al., 1996, Pena et al., 1997, Huwiler et al., 2000) und dadurch zu einer vermehrten Bildung von Ceramid führt. Dieser so genannte Sphingomyelin-Zyklus ist die Hauptquelle für Ceramid, das für die Signalweiterleitung von der Zelle genutzt wird (Levade und Jaffrézou, 1999, Kolesnick und Krönke, 1998, Liu et al., 1997, Perry und Hannun, 1998).

Darüber hinaus kann Ceramid auch *de novo*, wie bereits beschrieben, ausgehend von Serin und Palmitoyl-CoA gebildet werden, ein Prozess, der im endoplasmatischen Retikulum stattfindet (Huwiler et al., 2000). Diese *de novo* Synthese von Ceramid kann ebenfalls durch eine Reihe unterschiedlicher Stimuli wie z.B. durch Hypoxie induziert werden. Zahlreiche Gruppen konnten bisher zeigen, dass Ceramid eine zentrale Rolle in der zellulären Stressantwort spielt, einschließlich der Regulation von Apoptose, Wachstumsstopp und Differenzierung (Wiesner et al., 1997, Huwiler et al., 1997, Riboni et al., 1995, 1997, Perry und Hannun, 1998, Alesse et al., 1998, Levade und Jaffrézou, 1999, Huwiler et al., 2000, Skulachev, 2001, Maceyka et al., 2002, Pettus et al., 2002). Einige der von Ceramid abge-

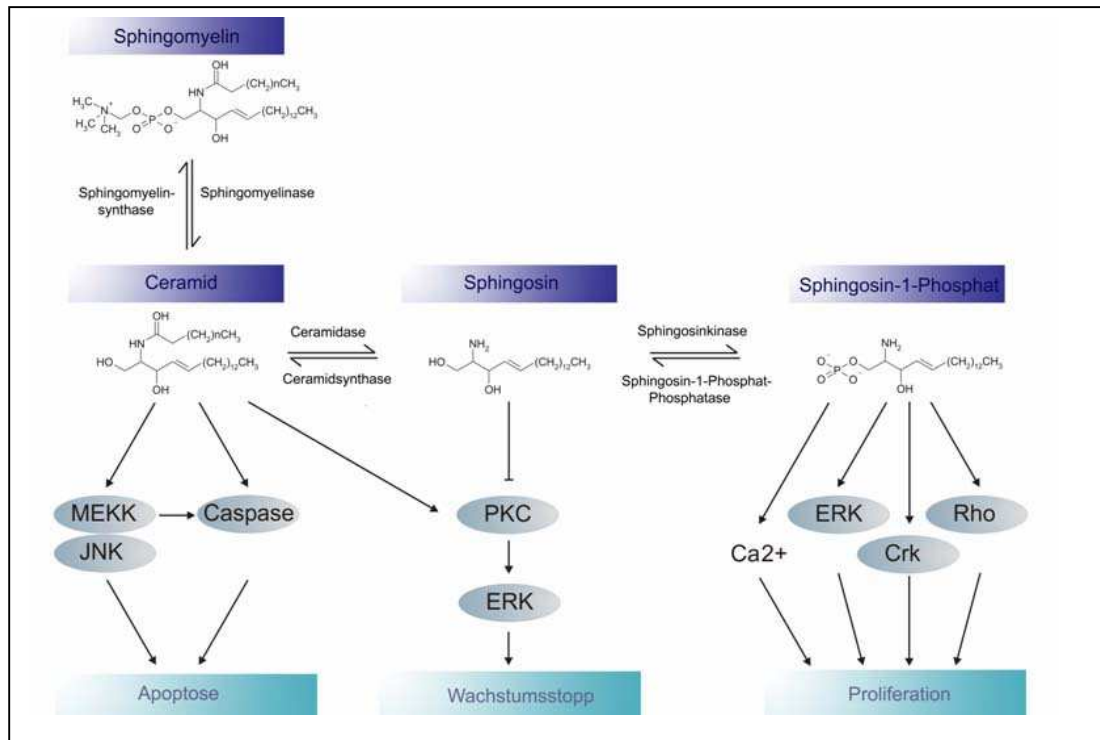


Abb. 6: Überblick über die durch Sphingolipide hervorgerufenen zellulären Antworten

leiteten Metabolite, vor allem Sphingosin-1-Phosphat, induzieren dagegen entgegengesetzte Zellantworten, wie Proliferation und Schutz vor Apoptose (Olivera und Spiegel, 1993, Gomez-Munoz et al., 1997, Pyne und Pyne, 2000, Uchida et al., 2002). Zahlreiche Gruppen konnten bisher zeigen, dass Ceramid entweder direkt mitogen- oder stressaktivierte Proteinkinase-Kaskaden (MAPK und SAPK) aktivieren kann (Coroneos et al., 1996, Subbaramaiah et al., 1996, Huwiler et al., 1996, Augé et al., 1998), die Gentranskription verschiedener Gene, wie z.B. der Cyclooxygenase-2, beeinflusst (Subbaramaiah et al., 1996, Hayakawa et al., 1996), zu Ceramidphosphat modifiziert wird oder durch Ceramidasen zu Sphingosin abgebaut werden kann. Darüber hinaus konnten die Blockade der Aktivierung der PI3-Kinase (Hanna et al., 1999, Zundel et al., 2000, Burow et al., 2000), eine Regulation des Tonus von glatten Muskelzellen (Ohanian et al., 1998, Ibitayo et al., 1998), Antworten auf oxidativen Stress (Hannun und Luberto, 2000) und eine Rolle in der NO-Signalkaskade (Huwiler et al., 2000, Pahan et al., 1998) für Ceramid nachgewiesen werden.

Die biologischen Funktionen von Sphingosin werden kontrovers diskutiert. Generell ist Sphingosin in die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung involviert (Huwiler et al., 2000, Spiegel und Merrill, 1996). Es konnte aber auch die Induzierung von Apoptose durch Sphingosin nachgewiesen werden (Sweeney et al., 1998, Sakakura et al., 1998, Cuvillier et al., 2000, 2001, Kågedal et al., 2001, Matsubara et al., 2001). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit von Sphingosin, Einfluss auf die Aktivität der für die Induzierung von Apoptose wichtigen Caspasen zu nehmen (Cuvillier et al., 2000, 2001). Als direktes Zielprotein von Sphingosin konnte von Hannun und Bell 1987 die Proteinkinase C

identifiziert werden. Daneben konnte ein inhibitorischer Effekt von Sphingosin auf die calmodulinabhängige Kinase, die p44/p42-Kinasen (ERK1, ERK2) und die Tyrosinkinase des Insulinrezeptors nachgewiesen werden, während die Diacylglycerinkinase, die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) und die Caseinkinase II durch Sphingosin aktiviert werden können (Jefferson und Schulman, 1988, Arnold, 1991, Yamada et al., 1993, McDonald et al., 1991, Jarvis et al., 1997, 1998, Sakakura et al., 1998).

Sphingosin-1-Phosphat wird in den Zellen in erster Linie durch die Phosphorylierung von Sphingosin durch Sphingosinkinasen gebildet (Spiegel und Merrill, 1996, Olivera et al., 1998, Kohama et al., 1998). Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Migration, der Proliferation und der Differenzierung von Zellen (Spiegel und Merrill, 1996, Igarashi, 1997, Goetzl et al., 1998, Hla et al., 1999, Huwiler et al., 2000, Pyne und Pyne, 2000, Balthasar et al., 2006, Takuwa, 2002, Malchinkhuu et al., 2005, Yamaguchi et al., 2003, Czeloth et al., 2005). Darüber hinaus konnte für Sphingosin-1-Phosphat auch eine wichtige Rolle bei der Metastasenbildung und der Proliferation von Krebszellen nachgewiesen werden (Ogretmen und Hannun, 2004). Die Konzentration von endogenem Sphingosin-1-Phosphat wird durch zahlreiche Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Agonisten von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, verändert (Hannun et al., 2001, Spiegel und Merrill, 1996, Olivera und Spiegel, 2001). Durch seine Fähigkeit, sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu wirken, stellt Sphingosin-1-Phosphat eine Besonderheit unter den Sphingolipiden dar. Extrazellulär wirkt Sphingosin-1-Phosphat über die Bindung an die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (früher Edg-Rezeptoren: „endothelial differentiation gene“). Diese Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und können zahlreiche Signalkaskaden aktivieren. So konnte eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, eine Aktivierung der Phospholipase C und D, der ERK („extracellular-signal-regulated kinase“), der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK), der p38-Kinase (p38 MAPK) und weiterer Tyrosinkinasen nachgewiesen werden (Kon et al., 1999, Pyne und Pyne, 2000, Spiegel und Milstien, 2000, Hla, 2001). Als intrazelluläres Signalmolekül spielt Sphingosin-1-Phosphat möglicherweise eine Rolle bei der IP_3 -abhängigen Mobilisierung von Calcium, bei der Inhibierung der Aktivität von Caspasen, bei der Aktivierung verschiedener Tyrosinkinasen und der Raf/MKK/ERK-Signalkaskade (Pyne und Pyne, 2000, Spiegel et al., 1998, Cuvilier et al., 1996, Mandala et al., 1998, 2000). Der Abbau von Sphingosin-1-Phosphat erfolgt zum einen über Dephosphorylierung durch die Sphingosin-1-Phosphatphosphatase, zum anderen über die Sphingosin-1-Phosphatlyase, die durch Spaltung der Bindung zwischen dem C2- und dem C3-Atom zur Bildung von Phosphoethanolamin und Palmitaldehyd (=Hexadecanal) führt (Veldhoven und Mannaerts, 1993). Aufgrund ihrer entgegengesetzten Effekte auf die Zellen geht man heute davon aus, dass die Balance zwischen Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat einen wichtigen zellulären Regelkreis bildet. Dieser so genannte Sphingosin-1-Phosphat/Ceramid-Regelkreis wird

letztlich reguliert durch die Aktivität der Enzyme, die den Umsatz dieser Sphingolipid-Metabolite kontrollieren und macht ein Verständnis der Regulation dieser Enzyme unbedingt erforderlich.

1.2.3 Die Ceramidasen

Ceramidasen sind die Enzyme, die durch ihre Aktivität die zellulären Konzentrationen von Ceramid und Sphingosin kontrollieren. Wichtig für die Bildung von Ceramid sind daneben noch die sauren und neutralen Sphingomyelinasen, die unter anderem durch proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und eine Reihe weiterer Stressfaktoren induziert werden können (Levade und Jaffrézou, 1999, Huwiler et al., 2000). Die Ceramidasen können eingeteilt werden in drei verschiedene Klassen (saure, neutrale und alkalische) entsprechend ihrem bevorzugten pH-Optimum und ihrer Genstruktur. Die saure Ceramidase ist in den Lysosomen der Zelle lokalisiert und vor allem für den Abbau von Ceramid verantwortlich (Bernado et al., 1995). Im Gegensatz dazu sind die neutralen und alkalischen Ceramidasen vor allem entscheidend für die Signaltransduktion und regulatorische Prozesse (Coroneos et al., 1995, Nikolova-Karakashian et al., 1997, El Bawab et al., 1999).

Die saure Ceramidase (pH-Optimum: pH 4,5) katalysiert den letzten Schritt beim Abbau von Glycosphingolipiden in den Lysosomen der Zelle (Bernado et al., 1995, Sandhoff und Kolter, 1997). Eine auf Mutationen in diesem Gen zurückzuführende Erkrankung stellt die Farbersche Lipogranulomatose dar. Dabei kommt es zu einer Akkumulation von nicht abgebautem Ceramid in den Lysosomen aller Zellen, was sich unter anderem in Schwellungen der Gelenke und Knötchenbildung unter der Haut äußert. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und führt je nach Restenzymaktivität bereits nach wenigen Jahren zum Tod. Die saure Ceramidase wurde erstmals aus humanem Urin aufgereinigt (Bernado et al., 1995, Ferlinz et al., 2001, Li et al., 1999) und die cDNA sowohl des humanen als auch des murinen Enzyms aus cDNA-Banken isoliert (Koch et al., 1996, Li et al., 1998). Das Enzym wird ubiquitär exprimiert, zeigt aber die höchste Aktivität in Nieren- und Hirngewebe. Die humane Form ist ein heterodimeres Protein bestehend aus einer nichtglykosylierten α -Untereinheit (13 kDa) und einer N-glykosylierten β -Untereinheit (40 kDa), die aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein von 55 kDa Größe durch enzymatische Spaltung hervorgehen (Koch et al., 1996).

Die neutrale Ceramidase (pH-Optimum: pH 6,5-8,5) ist von Bakterien bis zum Menschen hochkonserviert. Sie ist im Cytosol, in Endosomen und in der Plasmamembran lokalisiert. Außerdem wurde gezeigt, dass diese neutrale Ceramidase von Endothelzellen aktiv sezerniert wird (Romiti et al., 2000). Die Aktivität dieses Enzyms kann durch Zytokine und Wachstumsfaktoren modifiziert werden (Coroneos et al., 1995, Nikolova-Karakashian et al., 1997, Huwiler et al., 1999b, Franzen et al., 2001, 2002, 2002). Das zugehörige Gen wurde im Hirngewebe der Ratte (Mitsutake et al., 2001) identifiziert und das Enzym charakterisiert. Homologe wurden darüber hinaus in der Maus (Tani et al., 2000), im humanen System (El Bawab et al., 2000), in weiteren Geweben der Ratte (Mitsutake et al., 2001), in *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* (Okino et al., 1999), *Dictyostelium discoideum* (Monjusho et al., 2003), *Drosophila melanogaster* (Yoshimura et al., 2001) und in *Danio rerio* (Yoshimura et al., 2004) charakterisiert. Die neutrale Ceramidase ist ein Monomer von 70-110 kDa. Bei dem Enzym der Ratte handelt es sich beispielsweise um ein 112 kDa-Protein, das membrangebunden und hochglykosyliert vorliegt. Die Expression dieses Enzyms ist besonders hoch in Herz-, Hirn- und Nierengewebe der Ratte (Mitsutake et al., 2001). Die Aminosäureidentität zum humanen Enzym beträgt 76%, zum Enzym der Maus dagegen 92%.

Bei der alkalischen Ceramidase (pH-Optimum: pH 9,0-9,5) handelt es sich um ein 30 kDa bis 70 kDa großes Enzym, das in der Hefe und im humanen System näher charakterisiert worden ist (Mao et al., 2000, 2000, 2001). Darüber hinaus wurden Gene für alkalische Ceramidasen auch in *Dermatophilus congolensis* (García-Sánchez et al., 2004) und in *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen (Okino et al., 1999). Homologe konnten durch Gensequenzvergleiche auch in *Mycobacterium tuberculosis*, *Dictyostelium discoideum* und *Arabidopsis thaliana* gefunden werden, sind aber nicht näher charakterisiert. Die alkalische Ceramidase unterscheidet sich grundlegend in ihrer Sequenz von den beiden erstgenannten Ceramidasen. Sie besitzt ein pH-Optimum im alkalischen Bereich (pH 9,5), wird durch Calcium aktiviert und durch Zinkionen und Sphingosin inhibiert. Weitere Untersuchungen bezüglich dieses Enzyms stehen noch aus.

1.2.4 Die Sphingosinkinasen

Sphingosinkinasen kontrollieren durch die Phosphorylierung von Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat den Spiegel dieser beiden Sphingolipide in der Zelle. Prinzipiell unterscheidet man zwischen Sphingosinkinasen vom Typ 1 und 2. Die Sphingosinkinasen sind ubiquitär exprimierte Enzyme, bei denen eine Fünf-Domänenstruktur hochkonserviert vorliegt und von Bakterien bis zum Menschen zu finden ist.

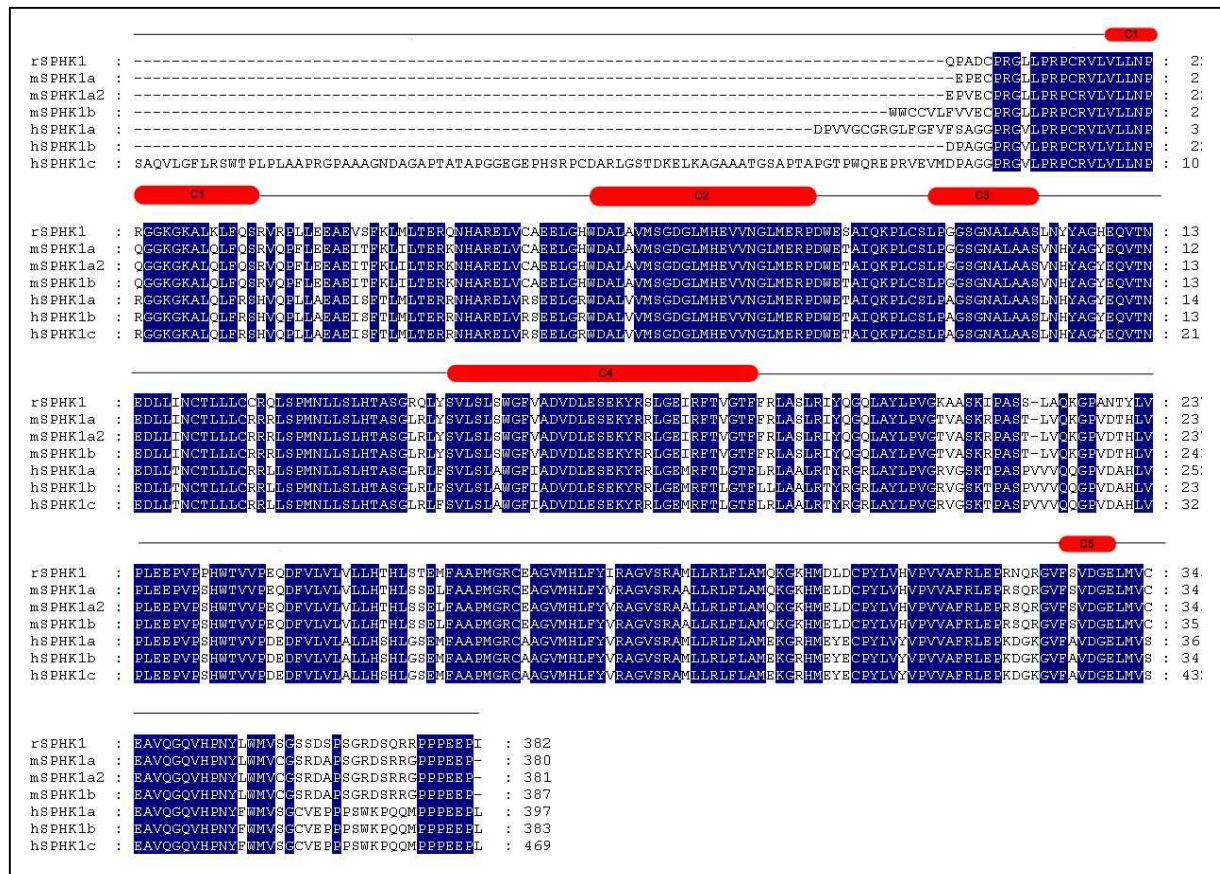


Abb. 7: Sequenzvergleich einiger Sphingosinkinasen vom Typ 1

Die Abbildung 7 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der Sphingosinkinase 1 von Mensch, Maus und Ratte. Die roten Balken markieren die in allen Sphingosinkinasen vom Typ 1 konservierten Domänen C1 bis C5. Blau unterlegt sind die in allen drei Spezies konservierten Aminosäuren.

Die Sphingosinkinase 1 der Ratte wurde erstmals von Olivera et al. (1998) aus Nierengewebe isoliert und näher charakterisiert. Es handelt sich um ein Enzym von 49 kDa und einem pH-Optimum im neutralen Bereich (pH 6,6-7,5). Es zeigt eine Substratspezifität für D-erythro-Sphingosin und kann durch DL-threo-Dihydrosphingosin und N,N-dimethylsphingosin kompetitiv inhibiert werden. Imamura et al. (2001, 2004) konnten nachweisen, dass das Gen für die Sphingosinkinase 1 der Ratte in einer so genannten CpG-Insel mit einem GC-Gehalt von über 60% liegt und im 5'-UTR acht alternativ gespleißte Exons aufweist. Dieses alternative Spleißen hat dabei allerdings keinen Einfluss auf die eigentlich kodierende Sequenz, d.h. die alternativen mRNA-Transkripte unterscheiden sich nicht in ihren proteinkodierenden Bereichen. Darüber hinaus ist das Gen für die Sphingosinkinase 1 der Ratte auf Chromosom 10 in einem Bereich lokalisiert, der bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und rheumatischer Arthritis eine Rolle zu spielen scheint (Remmers et al., 1996). Ähnliches gilt für das auf Chromosom 17q25 lokalisierte Gen der humanen Sphingosinkinase 1 (Melendez et al., 2000), bei dem dieser

Chromosomenbereich mit der Entstehung von Psoriasis, Sklerose und Epidermodysplasie assoziiert wird (Becker et al., 1998, Kuokkanen et al., 1997, Nair et al., 1997, Ramoz et al., 1999, Tomfohrde et al., 1994). Darüber hinaus konnte im Bereich des Genes für die Sphingosinkinase 1 der Ratte auch ein Antisense-Transkript (*Khps1a*) nachgewiesen werden, das wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung des DNA-Methylierungsmusters im Sphingosinkinase 1-Gen erforderlich ist (Imamura et al., 2004). Die Sphingosinkinase 1 wurde mittlerweile in einer ganzen Reihe von Organismen kloniert oder näher charakterisiert. Das entsprechende Maus-Homolog wurde 1998 von Kohama et al. kloniert und funktionell näher charakterisiert. Das humane Homolog wurde 2000 von Melendez et al. kloniert und charakterisiert. Von der humanen Kinase existieren mindestens drei alternative Transkripte *hSPHK1a*, *hSPHK1b* und *hSPHK1c*. Insgesamt konnte für die beiden humanen Homologe ebenfalls eine sehr breite Expression in zahlreichen Geweben, z.B. Leber, Niere, Herz und Muskel, nachgewiesen werden (Melendez et al., 2000, Nava et al., 2000, Murate et al., 2001). Darüber hinaus konnten Pitson et al. (2002, 2005) nachweisen, dass die Phosphorylierung der hSPHK1 durch Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) in HEK 293-Zellen zu einer Translokation des Enzyms zur Plasmamembran führt und auf diese Weise entscheidend zu seiner Aktivität beiträgt. Auch ein extrazellulärer Export der hSPHK1 konnte in diesen Zellen und in HUVEC-Zellen nachgewiesen werden (Ancellin et al., 2002). Venkataraman et al. (2006) konnten einen ähnlichen Mechanismus auch für mSPHK1a in vaskulären Endothelzellen nachweisen. Ebenso wichtig scheint die Phosphorylierung der Sphingosinkinase 1 durch einen ERK1/ERK2 vermittelten Weg zu sein (Pitson et al., 2003). Für die hSPHK1 konnte daneben noch ein nukleäres Exportsignal nachgewiesen werden, das aber in der rSPHK1 nicht vorhanden zu sein scheint (Inagaki et al., 2003).

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Sphingosinkinase 2 das Zellwachstum hemmt und sogar Apoptose induzieren kann, welches über eine in der Sequenz vorhandene BH3-Domäne vermittelt werden soll (Liu et al., 2002, Igarashi et al., 2003, Maceyka et al., 2005, Okada et al., 2005). Zusätzlich wurde berichtet, dass die Sphingosinkinase 2 auch Migration induzierende Effekte haben kann (Hait et al., 2005). Für die Phosphorylierung des immunsuppressiv wirkenden Sphingosin-Analogs FTY720 ist ebenfalls die Sphingosinkinase 2 verantwortlich (Paugh et al., 2003, Kharel et al., 2005). Über weitere Funktionen der Sphingosinkinase 2 ist wenig in der Literatur beschrieben. Datenbankrecherchen zeigen, dass die Sphingosinkinase 2 in allen Tierstämmen zu finden ist. Das Rattenhomolog (rSPHK2) kodiert für ein Protein von 615 Aminosäuren, während das Maushomolog (mSPHK2) 616 Aminosäuren enthält. Von der humanen Sphingosinkinase 2 existieren wiederum zwei unterschiedliche Varianten, hSPHK2a und hSPHK2b, die sich in der Länge

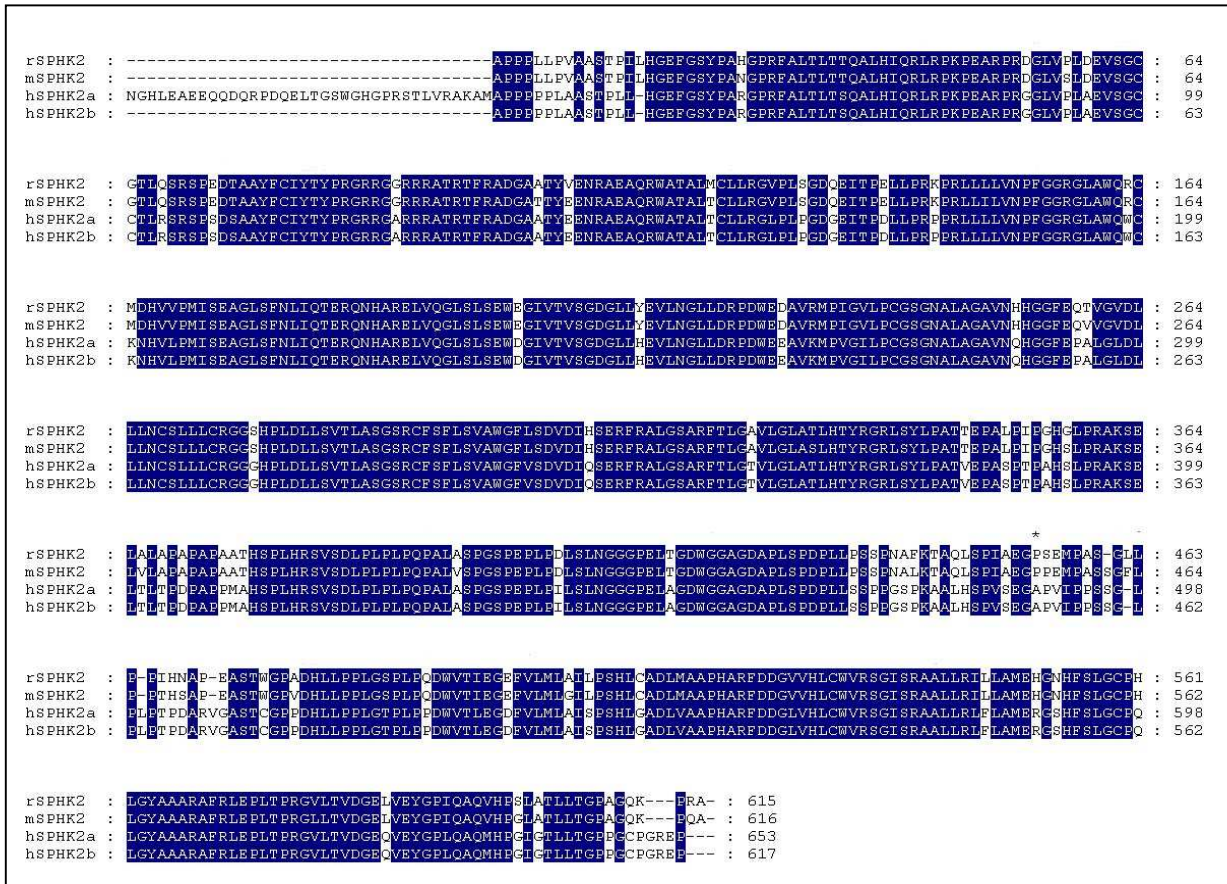


Abb. 8: Sequenzvergleich einiger Sphingosinkinasen vom Typ 2

Die Abbildung 8 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der Sphingosinkinase 2 von Mensch, Maus und Ratte. Blau unterlegt sind in der Abbildung die zwischen allen drei Spezies konservierten Aminosäuren.

des N-terminus voneinander unterscheiden. hSPHK2a ist dabei charakterisiert durch einen um 36 Aminosäuren verlängerten Aminoterminus.

1.3 Nukleotide und ihre Rezeptoren

Innerhalb der letzten Dekade setzte sich die Vorstellung, dass Adenin- und Uridinnukleotide wichtige extrazelluläre Signalmoleküle sind, immer mehr durch. Dies ist nicht zuletzt darauf zurückzuführen, dass mindestens 15 verschiedene Nukleotid-aktivierbare Rezeptoren existieren, deren Aktivierung eine breite Palette unterschiedlichster physiologischer Zellantworten reguliert. Die eigentlichen Mechanismen und Wege, die zur Freisetzung von Nukleotiden führen können, sind heute jedoch noch nicht vollständig geklärt. Seit langem bekannt ist die Freisetzung von ATP aus exzitatorischen und sekretorischen Geweben. Dies erfolgt meist über Exocytose nach Verpackung in synaptische Vesikel, chromaffine Partikel oder dichte Partikel und ist für Neuronen, chromaffine Zellen, Blutplättchen und Mastzellen nachgewiesen (Stone, 1991, Evans et al., 1992, Edwards und Gibb, 1993, Burnstock, 1990,

1997, Sørensen und Novak, 2001). Daneben existieren aber auch nicht-lytische Mechanismen zur Freisetzung von ATP aus nicht erregbaren Zellen, wie z.B. Epithel- und Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Astrocyten, Lymphocyten, Monocyten, Erythrocyten, Hepatocyten und zahlreichen anderen Zellkulturlinien. Zusätzlich existieren auch Agonisten-induzierte Mechanismen. So konnten Yang et al. bereits 1994 zeigen, dass Stimulation von Endothelzellen aus dem Herzen von Meerschweinchen mit Bradykinin, Acetylcholin oder Serotonin zu einer Freisetzung von ATP führt. Viele Zellen sezernieren darüber hinaus auch im Ruhezustand ATP, wie für humane vaskuläre Endothelzellen (HUVEC) nachgewiesen werden konnte (Schwiebert et al., 2002). Die Konzentration an freigesetztem ATP kann dabei je nach Zelltyp zwischen $10 \text{ fmol/min}/10^6$ Zellen bei C6 Rattengliomazellen bis hin zu $500 \text{ fmol/min}/10^6$ Zellen in ausdifferenzierten primären Epithelzellen der Bronchien reichen. Auch UTP kann in niedrig nanomolaren Konzentrationen im Überstand ruhender Zellen nachgewiesen werden. Diese Spiegel können bei allen untersuchten Zelltypen durch mechanische Stimulation oder durch Zugabe von Agonisten, wie etwa Thrombin, deutlich erhöht werden. In allen untersuchten ruhenden oder mechanisch stimulierten Zelltypen konnte ein Verhältnis von 1:3-5 für extrazelluläres UTP/ATP nachgewiesen werden, was den relativen intrazellulären Spiegeln dieser Nukleotide entspricht. Neben den bisher erwähnten Mechanismen für die Freisetzung der Nukleotide kommen darüber hinaus noch ABC-Transportsysteme (Abraham et al, 1993, Reisin et al., 1994), zug- und spannungsaktivierbare Kanäle (Braunstein et al., 2001, Sackin, 1995) und Connexin-Hemikanäle (Coco et al., 2003, Stout et al., 2002) in Frage.

1.3.1 Purinrezeptoren

Extrazelluläre Purine (ATP, ADP und Adenosin) und Pyrimidine (UTP, UDP) gehören zu den wichtigen Signalmolekülen, die zahlreiche zelluläre Antworten wie Muskelkontraktion, Neurotransmission, Immunantworten, Entzündungsreaktionen, Plättchenaggregation, Schmerzwahrnehmung und Modulation der Herzfunktion durch Bindung an die entsprechenden Oberflächenrezeptoren, die so genannten Purinrezeptoren regulieren (Burnstock und Kennedy, 1986, Gordon, 1986, Seifert und Schultz, 1989, Burnstock, 1990, Olsson und Pearson, 1990, Ralevic und Burnstock, 1991a, Jacobson et al., 1992b, Dubyak und el-Moatassim, 1993, Dalziel und Westfall, 1994, Fredholm, 1995, Burnstock und Wood, 1996, Ongingi und Fredholm, 1996, Sebastião und Ribeiro, 1996). Erste Untersuchungen in diesem Feld begannen 1929 mit Drury und Szent-Györgyi und 1934 mit Gillespie. Heute unterscheidet man zwei große Familien von Purinrezeptoren, die P1- und die P2-Rezeptoren, eingeteilt nach der Art ihrer Agonisten. Beide Familien können noch in weitere Subtypen unterteilt werden. Die Klassifizierung dieser Subtypen basiert auf molekularen

Daten, wobei Unterschiede von 30-40% ausreichen, um einen Subtyp von einem zweiten zu unterscheiden.

1.3.1.1 P1-Rezeptoren

P1-Rezeptoren sind Adenosinrezeptoren und werden in A_1 -, A_{2a} -, A_{2b} - und A_3 -Rezeptoren unterteilt. Diese Rezeptoren wurden bereits in zahlreichen Spezies kloniert, weisen aber untereinander nur eine geringe Homologie auf. Alle P1-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Der natürliche Ligand aller P1-Rezeptoren ist Adenosin. Darüber hinaus können auch verschiedene synthetische Derivate von Adenosin wie β,γ -methylen-ATP (β,γ -me-ATP) Effekte an den verschiedenen Subtypen auslösen. Der A_1 -Rezeptor ist dabei in aller Regel $G_{i/o}$ -gekoppelt und dadurch Pertussis toxin-sensitiv (Freissmuth et al., 1991, Munshi et al., 1991, Fredholm et al., 1989, Hasuo et al., 1992). Er wirkt vor allem über die Inhibierung der Adenylatcyclase oder die Aktivierung einer Phospholipase C (Van Calcar et al., 1978, Megson et al., 1995). A_{2a} -Rezeptoren sind empfindlich gegenüber Choleratoxin, was auf eine Kopplung an G_s -Proteine und damit eine nachfolgende Aktivierung der Adenylatcyclase gekoppelt an Freisetzung von Calcium hinweist (Palmer und Stiles, 1995). A_{2b} -Rezeptoren wurden in zahlreichen Geweben und Spezies kloniert und koppeln an G_q/G_{11} -Proteine; sie initiieren verschiedene Signalkaskaden, angefangen mit der Aktivierung der Adenylatcyclase, über die Aktivierung der Phospholipase C bis hin zu einem IP_3 -abhängigen Anstieg von intrazellulärem Calcium (Feoktistov und Biaggioni, 1995, Yakel et al., 1993). Der A_3 -Rezeptor interagiert mit $G_{i\alpha 2}$ -, $G_{i\alpha 3}$ - und $G_{q/11}$ -Rezeptoren (Palmer et al., 1995) und stimuliert damit die Phospholipase C. Die durch die P1-Rezeptorsubtypen kontrollierten biologischen Prozesse sind äußerst vielfältig und umfassen unter anderem die Regulation der Kontraktion von Mesangiumzellen, die Inhibierung der Neurotransmitterfreisetzung, die Freisetzung von Renin aus der Niere, die Reduktion der Apoptoserate in Neutrophilen und die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen (Olivera et al., 1989, Munger und Jackson, 1994, Churchill und Churchill, 1985, Zhang et al., 1996, Walker et al., 1996, Ramkumar et al., 1993). Einen guten Überblick über alle durch diese Rezeptoren vermittelten Antworten geben Ralevic und Burnstock (1998).

1.3.1.2 P2-Rezeptoren

P2-Rezeptoren können in zwei Subklassen unterteilt werden, in die ionotropen P2X-Rezeptoren, die Ionenkanäle darstellen, und in die metabotropen P2Y-Rezeptoren, die alle G-protein gekoppelt vorliegen (Abbraccio und Burnstock, 1994, Fredholm et al., 1994). Bis heute wurden sieben P2X-Rezeptoren (P2X₁₋₇) in Säugetieren beschrieben, daneben existieren acht unterschiedliche P2Y-Rezeptoren (P2Y_{1,2,4,6,11-14}). Die verschiedenen P2X-Rezeptoren liegen dabei oft koexprimiert vor und bilden Rezeptoren aus mehreren Untereinheiten bestehend aus Heteromeren. Allen P2-Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie durch ein breites Spektrum natürlich vorkommender Liganden aktiviert werden können. Zu diesen Liganden zählen ATP, ADP, UTP, UDP und die Diadenosinpolyphosphate. Da die Potenz eines bestimmten Liganden auch abhängig von der Aktivität von Ecto-Endonukleotidasen ist, die im Extrazellularraum vorhandene Nukleotide angreifen und abbauen können, werden für die Untersuchung der Effekte an den unterschiedlichen Rezeptoren bevorzugt stabile Analoga der natürlichen Liganden eingesetzt, wie z.B. α,β -methyl-ATP oder γ -S-ATP.

P2X-Rezeptoren sind wie bereits erwähnt Ionenkanäle, die durch die Bindung von ATP geöffnet werden können, um dann Na²⁺, K⁺ und Ca²⁺-Ionen passieren zu lassen (Bean, 1992, Dubyak und El-Moatassim, 1993, North, 1996). Man findet diese Rezeptoren bevorzugt auf erregbaren Geweben, wie glatten Muskelzellen, Neuronen, Glia-Zellen und im zentralen und peripheren Nervensystem, wo sie verantwortlich sind für die schnelle Erregungsweiterleitung initiiert durch ATP (Bean, 1992, Dubyak und El-Moatassim, 1993, North, 1996). Die einzelnen P2X-Subtypen sind zwischen 379 und 472 Aminosäuren groß und bilden heteromere Ionenkanäle bestehend aus mehreren einzelnen Subtypen, die sich zu einem Kanal zusammenlagern. Einen guten Einblick in die unterschiedlichen P2X-Rezeptoren liefern Ralevic und Burnstock (1998).

P2Y-Rezeptoren werden sowohl von Purinen als auch Pyrimidinen aktiviert. Sie gehören alle zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und sind zwischen 308 bis 377 Aminosäuren groß. Nach Glykosylierung liegen sie als 41 kDa bis 53 kDa große Proteine vor. Die meisten dieser Rezeptoren aktivieren die Phospholipase C, was zur Bildung von IP₃ und DAG und letztlich zur Mobilisierung von intrazellulärem Calcium führt. Dies wiederum kann eine Vielzahl von Signalkaskaden initiieren, wie z.B. Aktivierung von Proteinkinasen C, Phospholipasen A₂, C und D oder Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), sowie von calciumabhängigen Kaliumkanälen (Bowden et al., 1995, Patel et al., 1996, Purkiss und Boarder, 1992, Pfeilschifter und Merriweather, 1993, Gerwins und Fredholm 1995a,b, Communi et al., 1996a). Außerdem wurde für einige P2Y-Rezeptoren auch die Aktivierung oder Inhibierung der Adenylatcyclase nachgewiesen (Webb et al, 1996c, Boyer et al., 1993,

1995). Diese Rezeptoren sind ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, z.B. in Plazenta (Léon et al., 1995, 1997, Communi et al., 1996b, 1997, Stam et al., 1996) und Hirngewebe (Schachter et al., 1996, Filtz et al., 1994, Webb et al., 1993, 1995, 1996a). Die meisten Zellen exprimieren mehr als einen Typ von P2-Rezeptor. So findet man beispielsweise an Mesangiumzellen sowohl P2Y- (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆) als auch P2X-Rezeptoren (P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇) (Solini et al., 2007). Dies erlaubt eine Regulation über unterschiedliche Effektoren, ein „Fine-Tuning“ der durch die Agonisten induzierten Antworten und natürlich auch synergistische Effekte.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, welche wichtigen zellulären Funktionen von den zwei Sphingolipiden Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat reguliert werden. Interessanterweise regulieren diese zwei Lipide geradezu gegensätzliche Zellantworten. Da beide Lipide sehr schnell durch die Aktivität der Ceramidasen und Sphingosinkinasen ineinander umgewandelt werden können, ist das Verständnis der Regulation beider Enzymklassen von entscheidender Bedeutung um zu verstehen, wann und wieso Ceramid überwiegt und es zu einer pro-apoptotischen Zellantwort kommt, oder wann und aus welchem Grund Sphingosin-1-Phosphat überwiegt und die Zellen dadurch vor Apoptose geschützt werden und proliferieren. In Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die für Mesangiumzellen potenten Mitogene ATP und UTP einen Einfluss auf die Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels haben. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Regulation der Sphingosinkinase 1. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche durch ATP und UTP induzierten zellulären Antworten, wie Migration und Proliferation, durch die Aktivierung der Sphingosinkinase 1 und damit durch vermehrte Bildung von Sphingosin-1-Phosphat vermittelt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

2.1.1 Isolierung von Mesangiumzellen aus Nierengewebe

Die Mesangiumzellen der Ratte (MZB1) wurden von Herrn Prof. Dr. Josef Pfeilschifter isoliert. Die verschiedenen Mausmesangiumzellen (mSPHK1 wt, mSPHK1^{-/-}, hSPHK1 überexprimiert) wurden von Frau Dr. med. vet. Lotte P. Hofmann isoliert.

2.1.2 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C unter 5% CO₂ und 20% Wasser in einem Inkubator der Firma Heraeus (BBD 6220) inkubiert.

2.1.2.1 Kultivierung von Mesangiumzellen

Rattenmesangiumzellen wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium unter Zusatz von 10% (v/v) FCS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Insulin (6 µg/ml), Transferrin (5 µg/ml), Natriumselenit (5 ng/ml) und 10 mM HEPES (pH 7,4) kultiviert. Das Medium für die Kultivierung der Mausmesangiumzellen enthielt RPMI 1640, 15% (v/v) FCS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Insulin (6 µg/ml), Transferrin (5 µg/ml), Natriumselenit (5 ng/ml), 10 mM HEPES (pH 7,4) und β-Mercaptoethanol (4,5 µg/ml). Für die humanen Mesangiumzellen wurde dem RPMI 1640 10% (v/v) FCS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Insulin (6 µg/ml), Transferrin (5 µg/ml), Natriumselenit (5 ng/ml), 10 mM HEPES (pH 7,4), nicht essentielle Aminosäuren, L-Glutamin (2 mM) und Natriumpyruvat (1 mM) zugesetzt.

2.1.2.2 Kultivierung von HEK-Zellen

Die Kultivierung der HEK 293-Zellen erfolgte in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), das mit 10% (v/v) FCS, Penicillin (100 U/ml), sowie Streptomycin (100 µg/ml) versetzt worden war. Für die Selektion stabil transfizierter HEK-Zellen wurde das Kulturmedium zusätzlich mit 400 µg/ml Geneticin versetzt.

2.1.2.3 Subkultivierung adhärent wachsender Zellen

Für die Subkultivierung wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Mesangiumzellen und die HEK 293-Zellen mit Trypsin/EDTA (1ml/T75-Flasche) behandelt, bis sie sich vom Kulturgefäßboden ablösten. Anschließend wurden die Zellen nach entsprechender Verdünnung (1:3 bis 1:10) in neue Zellkulturflaschen überführt und weiter wie unter 2.1.2 beschrieben kultiviert.

2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Kryokonservierung wurde nach Doyle et al. (1989) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen trypsiniert, abzentrifugiert (5 min, 1000 x g) und in Einfriermedium (Kulturmedium/FCS 1:1 mit 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Nach dem Einfrieren bei -20°C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit warmem Kulturmedium in ein 15 ml Falcon überführt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen wie unter 2.1.2 angegeben kultiviert.

2.1.4 Stimulation von Mesangiumzellen

Für alle Zellkulturexperimente wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zellen für 24 h in Hungermedium inkubiert. Dabei handelte es sich bei den HEK 293- und den Rattenmesangiumzellen um Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einem BSA-Anteil (fettsäurefrei) von 0,1 mg/ml. Für die humanen Mesangiumzellen wurde dem DMEM 1% (v/v) fötales Kälberserum zugesetzt. Die Mesangiumzellen der Maus wurden in DMEM mit 1% (v/v) fötalem Kälberserum und 5 nM β -Mercaptoethanol inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation wie angegeben für unterschiedliche Zeiträume bzw. mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu untersuchenden Stoffes in frisch zugewaschtem Hungermedium.

2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für die Transfektion wurden 2×10^5 bis 2×10^6 Zellen/cm² einen Tag vor der Transfektion ausgelegt, so dass sie am nächsten Tag zu 50-80% konfluent waren. Die nachfolgenden Angaben beziehen sich jeweils auf ein Transfektionsvolumen von einem Milliliter. Die Transfektionsreaktionen wurden jeweils gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Oligonukleotid (20 μM Stammlösung)	DMEM	Oligofectamin™- Reagenz	Lösungsvolumen (Oligofectamin™- Reagenz)	DMEM (Zellen)	Medium (30 % FCS (v/v))
10 μl	175 μl	4 μl	11 μl	800 μl	500 μl

Tab. 1: Transfektion mit Oligofectamine™-Reagenz

Plasmid	Plus Reagenz™	DMEM	LipofectAMINE™	Kulturmedium (Zellen)	
1 μg	6 μl	100 μl	4 μl	800 μl	

Tab. 2: Transfektion mit LipofectAMINE PLUS™ Reagenz

Plasmid	Enhancer™	Puffer EC	Effectene-Reagenz™	Lösungsvolumen (Transfektionsansatz)	Kulturmedium (Zellen)
1 µg	8 µl	150 µl	25 µl	600 µl	1600 µl

Tab. 3: Transfektion mit Effectene™-Transfektionsreagenz

Die Funktionalität der jeweils eingesetzten siRNA wurde mit Hilfe von Westernblot-Analysen und PCR-Experimenten überprüft. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.1.4 beschrieben für weitere Experimente verwendet. Für die stabile Transfektion von Säugerzellen wurde in der Regel LipofectAMINE PLUS™ Reagenz verwendet. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen durch Zusatz von 400 µg/ml Geneticin (G418) unter Selektionsdruck gesetzt. Die nicht transfizierten Zellen starben dadurch ab und die überlebenden Zellen enthielten das gewünschte Transgen. Zum Nachweis der Expression wurden die Zellen wie unter 2.4.1.1 beschrieben lysiert und mit Hilfe eines Western Blots analysiert.

2.1.6 Kultivierung von Bakterienzellen

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde der E.coli-Stamm XL1-Blue verwendet. Die Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert. Für die Selektion wurde das Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) versetzt. Für die Blau-Weiß-Selektion von Agarplatten wurde zusätzlich noch X-Gal (40 µg/ml) und IPTG (0,2 mM) zugesetzt.

2.1.7 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemokompetenter Bakterien wurden diese zunächst auf einer LB-Agarplatte ohne Ampicillin fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Von einer einzelnen Kolonie wurde eine Übernachtskultur mit 3 ml LB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft und auf dem Schüttler bei 37°C kultiviert. Davon wurden am nächsten Morgen 150 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,5 inkubiert. Die Bakterien wurden dann für 15 min bei 4°C und 1000 x g abzentrifugiert und in 50 ml kaltem TFBI-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4°C und 1000 x g. Das Pellet wurde in TFBII-Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis gehalten. Abschließend wurden die Zellen à 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –70°C gelagert.

2.1.8 Transformation von Bakterien

100 µl der kompetenten Bakterien wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut und 3 µl des jeweiligen Ligationsansatzes zugefügt. Die Bakterien wurden dann für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 42°C für 1 min, die Zugabe von 200 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) und eine Kultivierung der Bakterien bei 37°C für eine Stunde auf dem Schüttler. Anschließend wurden 150 µl des jeweiligen Transformationsansatzes auf Agarplatten mit X-Gal (40 µg/ml), IPTG (0,2 mM) Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden nur weiße Kolonien gepickt und in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum vermehrt.

2.2 Bestimmung zellulärer Parameter

2.2.1 Nachweis der Migrationsfähigkeit von Säugerzellen mit Hilfe des Transwell-Tests

Die Migrationsfähigkeit wurde mit einer adaptierten Boyden-Kammer gemäß Keely (2001) untersucht. Dazu wurden spezielle Kulturplatten der Firma Corning Inc. verwendet. Diese sogenannten Transwellplatten bestehen aus zwei Kammersystemen, einer oberen und einer unteren Kammer, die durch eine Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße von 8 µm getrennt sind. Die Porengröße der Membran erlaubt es den Zellen, nur aktiv durch Veränderung ihrer Form von der oberen zur unteren Kammer zu migrieren.

Vor Versuchsbeginn wurde die obere Kammer der Transwellplatte zunächst mit 500 µl PBS gewaschen. Die 24 Stunden serumfrei kultivierten, ruhenden Zellen wurden mit Trypsin/EDTA gelöst, einmal mit Hungermedium gewaschen und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. In die untere Kammer wurden 500 µl Hungermedium vorgelegt. In die obere Kammer wurden 100 µl der Zellsuspension mit dem entsprechenden Stimulus pipettiert. Die Zellen wurden dann 24 Stunden oder zeitabhängig bei 37°C inkubiert. Danach wurden die nicht migrierten Zellen von der Membranoberfläche der oberen Kammer mit Hilfe eines Wattestäbchens entfernt, die Membran dann mit PBS gewaschen und in 550 µl Fixierlösung für 30 min fixiert. Anschließend wurde die obere Kammer mit 550 µl Wasser gefolgt von Methanol (100 %) gewaschen, bevor die migrierten Zellen mit DAPI (1 µg/ml) für 15 min bei 37°C gefärbt wurden. Überschüssiges DAPI wurde durch einmaliges Waschen in Methanol (100 %) entfernt. Nach dem Trocknen der Membran (über Nacht bei 37°C) wurden die angefärbten Zellen im Fluoreszenzmikroskop (380nm) mit dem 20 x Objektiv ausgewertet. Dazu wurden pro Membran 5 Gesichtsfelder ausgezählt und hiervon der Mittelwert bestimmt.

2.2.2 Nachweis der Proliferation von Säugerzellen mittels [³H]-Thymidin-Einbau

Zum Nachweis der Proliferation von Zellen wurden diese auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt in 24 well-Kulturplatten ausgesät. 24 Stunden vor dem Beginn der Stimulation, wenn die Zellen zu 80-90% konfluent vorlagen, wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Hungermedium zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem entsprechenden Stimulus in 500 µl Hungermedium in Anwesenheit von 1 µCi/ml [³H]-Thymidin für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Beenden der Proliferation wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation in 1 ml 5% (w/v) Trichloressigsäure für 30 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit je 1 ml 5% (w/v) Trichloressigsäure gewaschen und die DNA mit 500 µl 1N Natronlauge für 30 min bei 37°C gelöst. Diese Lösung wurde in Szintillationsgefäße überführt und mit 250 µl Eisessig neutralisiert. Nach Zugabe von 2 ml Szintillationscocktail und kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurde der [³H]-Thymidin-Einbau in einem β-Counter der Firma Perkin-Elmer bestimmt.

2.2.3 Nachweis der Enzymaktivität

2.2.3.1 Sphingosinkinase-Aktivitätsassay

Zur Analyse der Sphingosinkinase-Aktivität wurden die Zellen wie unter 2.1.4 beschrieben mit dem entsprechenden Stimulus für den entsprechenden Zeitraum oder mit der genannten Konzentration stimuliert und anschließend nach Waschen mit PBS durch Zugabe von 250 µl Lysispuffer (pro 60 mm-Diameter-Schale) lysiert. Nach dem Aufarbeiten der Zellen wie unter 2.4.1.1 beschrieben wurden 30-50 µg Protein in einem Endvolumen von 180 µl Kinasepuffer (1 oder 2, je nach untersuchter Kinase) aufgenommen und zusammen mit 10 µl 1 mM Sphingosin (gelöst in 4 mg/ml BSA in PBS), 200 mM MgCl₂ und 0,1 µl γ-[³²P] ATP (10 µCi/20mM) pipettiert und bei 37°C für 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl 1N HCl und 800 µl Chloroform/Methanol/Salzsäure (100:200:1, v/v) wurden die Proben durch Vortexen gründlich gemischt. Anschließend wurden je 240 µl Chloroform und 240 µl 2 M KCl zugegeben, gemischt und 5 min bei 13.000 rpm (10.000 x g) zentrifugiert. 50 µl der unteren Phase wurden auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte (TLC-Platte) aufgetragen und für 4h mit einem Laufmittelgemisch aus 1-Butanol/Ethanol/Essigsäure/Wasser (80:20:10:20, v/v) aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte am darauffolgenden Tag mit einem Imaging-System der Firma Fuji.

2.2.3.2 Neutrale Ceramidase-Aktivitätsassay

Zur Analyse der Aktivität der neutralen Ceramidase wurden die Zellen wie unter 2.1.4 beschrieben stimuliert und anschließend nach Waschen mit PBS durch Zugabe von Lysispuffer lysiert und mit einem Zellschaber geerntet. Nach dem Aufarbeiten der Zellen wie unter 2.4.1.1 beschrieben wurden 30-50 µg Protein in einem Endvolumen von 200 µl Ceramidasepuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl [¹⁴C]-Ceramid wurden die Proben 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 200 µl Wasser folgte eine Chloroform/Methanol-Extraktion. Dafür wurden 2 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) zugegeben und gemischt. Die untere Phase wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine zweite Extraktion nach erneuter Zugabe von 2 ml Chloroform. Anschließend wurde die untere Phase in das Zentrifugenröhrchen überführt und mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Nach Lösen der getrockneten Lipide in 40 µl Chloroform/Methanol (1:1, v/v dann 95:5, v/v) wurden die Proben auf eine TLC-Platte übertragen. Nach dem Auftrennen der Proben mit einem Laufmittel aus Chloroform/Methanol/37%igem Ammoniak (90:20:1) erfolgte die Auswertung am darauffolgenden Tag mit einem Imaging-System der Firma Fuji.

2.2.4 Quantitative Ceramid-, Sphingosin- und Sphingosin-1-Phosphat-Bestimmung (LC/MS/MS)

Für die quantitative Bestimmung der Ceramid-, Sphingosin- und Sphingosin-1-Phosphatspiegel der Zellen wurden diese zunächst bis zur Konfluenz kultiviert, für 24 h mit Hungermedium gehungert und anschließend wie unter 2.1.4 beschrieben stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml Methanol, der einen internen Standard von C17-Ceramid (5 ng/ml), C17-Sphingosin (20 ng/ml) und C17-Sphingosin-1-Phosphat (20 ng/ml) enthielt, für eine Stunde bei 4°C nach Zusatz von 35 µl HCl (1 M) inkubiert. Danach wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Kulturgefäß gelöst und in ein Reagenzglas überführt. Das Kulturgefäß wurde erneut mit 1,2 ml Methanol gespült und mit der Methanollösung im Reagenzglas vereinigt. Zu dieser Mischung wurden 1,6 ml Salzlösung sowie 2 ml Chloroform zugegeben, durch Vortexen gemischt und anschließend die untere Phase in ein Zentrifugenröhrchen (zuvor ebenfalls mit Chloroform und Methanol gereinigt) überführt. Es folgte ein zweiter und dritter Extraktionsschritt nach erneuter Zugabe von 2 ml bzw. 1 ml Chloroform. Die kombinierten Chloroform-Phasen im Zentrifugenglas wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge eingedampft, in 200 µl DMSO mit 2 % (v/v) HCl wieder gelöst, unlösliche Partikel durch eine kurze Zentrifugation abgetrennt und die Proben abschließend in Massenspektrometrie-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte in einem Tandem-Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (ABI 4000 Q-Trap). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des zugehörigen Programmpakets der Firma Applied Biosystems.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Techniken

2.3.1.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA wurden die stimulierten Zellen nach Entfernung des Mediums mit 1 ml TRIZOL™ Reagenz überschichtet und mit Hilfe eines Zellschabers von den Platten gelöst. Anschließend wurde die Zell-TRIZOL™-Mischung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur an, um die Zellen komplett aufzuschließen und die Nukleinsäuren freizusetzen. Im Folgenden wurden 200 µl Chloroform zugesetzt und die Lösung mehrfach invertiert. Es schloss sich eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur und ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 4°C und 13.000 rpm an. Nach der Phasentrennung wurde die obere RNA-haltige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 750 µl Isopropanol vermischt und bei Raumtemperatur für weitere 10 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 4°C und 13.000 rpm wurde der Überstand entfernt und 500 µl 70% Ethanol zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur zur Lösung überflüssiger Salze folgte eine abschließende Zentrifugation von 5 min bei 4°C und 13.000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei 37°C im Heizblock für 5 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet je nach Größe in 25-50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und durch eine Inkubation von 20 min bei 55°C im Heizblock wieder gelöst. Zuletzt wurde die RNA-Konzentration wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.3.1.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch. Dazu wurde die Extinktion E von 1 µl der zu messenden RNA-Lösung in einem Photometer (NanoTrop, ND-1000 Spectrophotometer) bei 260 nm bestimmt. Aus der Extinktion wurde durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 1 und dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ für RNA (0,033) die Konzentration der RNA in der Lösung in µg/µl berechnet. Die Reinheit der RNA ist definiert durch das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm bzw. 280 nm zueinander. Das Verhältnis von E_{260}/E_{280} liegt bei weitgehend proteinfreier RNA bei einem Wert von ca. 2,0. Davon abweichende Werte zeigen Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol an.

2.3.1.3 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)

Für die cDNA-Erststrangsynthese wurde die „M-Mul-V-Reverse Transkriptase“ der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) zusammen mit 2 µg der Gesamt-RNA und 10 pM eines entsprechenden Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primers bzw. eines Hexanukleotid-Primers (für die quantitative Real-Time-Analyse) nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Die so hergestellte cDNA diente als Matrize für PCR-Analysen und für quantitative Real-Time-Analysen. Dabei wurden sowohl in einer Standard-PCR-Reaktion als auch in der Real-Time-Analyse je 0,1 Volumen der cDNA eingesetzt, sowie 10 pM der genspezifischen Primer.

2.3.1.4 Quantitative Real-Time-PCR (Taqman)

Sämtliche Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Um Pipettierfehler zu minimieren wurden immer Duplikate eines Ansatzes pipettiert, sowie Mastermixe verwendet. Für die Analyse wurden jeweils 2 µg RNA mit Hilfe von Hexanukleotid-Primern in cDNA umgeschrieben. Für die Analysen wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

18s RNA:

2 µl cDNA
je 0,25 µl Primer
0,25 µl Sonde (VIC-markiert)
12,5 µl PCR-Mix (ABgene)
10,25 µl Wasser

untersuchtes Gen:

2 µl cDNA
1,25 µl genspezifische Sonde
(FAM-markiert) inklusive Primer
12,5 µl PCR-Mix (ABgene)
8,75 µl Wasser

Die Proben wurden gut gemischt und anschließend auf eine 96-well-Platte überführt. Der PCR-Lauf erfolgte in einem Applied Biosystems 7700 HT Sequence Detection System. Die PCR-Bedingungen waren für alle untersuchten Gene wie folgt: 5 sec 50°C, 15 min 94°C, 15 sec 94°C, 1 min 60°C (40 x). Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Hierfür wurde der erhaltene CT-Wert des zu untersuchenden regulierten Genes (GOI; in diesem Falle die Sphingosinkinasen) mit dem CT-Wert eines unter den gewählten Stimulationsbedingungen unregulierten Gens (HKG; in diesem Fall 18sRNA) nach folgender Formel berechnet, um die relative Expressionsregulation zu erhalten:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-(S \Delta C_T - C \Delta C_T)}$$

ΔC_T : Differenz der CT-Werte von reguliertem Gen zu unreguliertem Gen
 $S \Delta C_T - C \Delta C_T$: Differenz zwischen den regulierten Proben $\Delta C_T(S \Delta C_T)$ und der Kontrolle $\Delta C_T(C \Delta C_T)$

2.3.2 DNA-Techniken

2.3.2.1 DNA-Präparation

Die für die Gewinnung der Promotorfragmente erforderliche genomische DNA der Ratte wurde von der Firma Novagen bezogen.

2.3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit der Firma PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) aus 5 ml einer Übernacht-Kultur nach den Angaben des Herstellers gewonnen. Das Prinzip beruht auf einer alkalischen Lyse modifiziert nach Birnboim und Doly (1979).

2.3.2.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch. Dazu wurde die Extinktion E von 1 μl der zu messenden DNA-Lösung in einem Photometer (NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer) bei 260 nm bestimmt. Aus der Extinktion wurde durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 1 und dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ für doppel- bzw. einzelsträngige DNA (0,047 bzw. 0,033) die Konzentration der DNA in der Lösung in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ berechnet. Die Reinheit der DNA ist definiert durch das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm bzw. 280 nm zueinander. Bei weitgehend proteinfreier DNA liegt das Verhältnis bei ca. 1,8. Niedrigere Werte zeigen Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol an, höhere Werte deuten auf RNA-Kontamination hin.

2.3.2.4 DNA-Fällung

Zur Fällung der DNA wurden 0,1 Volumen 10 x Dialysepuffer und 2 Volumen kaltes Ethanol (96%) zum Ansatz hinzugefügt, gemischt und 10 min bei -20°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation von 15 min bei 4°C und 13.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und die DNA durch Zusatz von 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren für 5 min bei 4°C und 13.000 rpm wurde das Pellet luftgetrocknet und in einem entsprechenden Volumen Wasser gelöst.

2.3.2.5 DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firma MBI Fermentas. Dabei wurden die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen berücksichtigt. Für die Restriktionen verwendet wurden BamHI (10 U/ μl), DpnI (10 U/ μl), EcoRI (10 U/ μl), KpnI (10 U/ μl), NlaIV (10 U/ μl), NotI (10 U/ μl), SacII (10 U/ μl), Tsp45I (10 U/ μl) und XhoI (10 U/ μl). In der Regel wurde die DNA mit 0,1 Volumen des Restriktionspuffers versetzt und 10 U des jeweiligen

Enzymes zugegeben. Die Restriktion erfolgte für 2 h bei 37°C und wurde durch Hitzedenaturierung der Enzyme (20 min bei 65°C) abgeschlossen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Restriktionen bei -20°C gelagert.

2.3.2.6 DNA-Standardgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Moleküle wurde nach Zugabe von 0,2 Volumen DNA-Ladepuffer mit Hilfe von 1-2%igen Agarosegelen bei einer Stromstärke von 70-100 V durchgeführt. Als Laufpuffer und zum Lösen der Agarose diente 1 x TAE-Puffer. Die Färbung der DNA-Fragmente im Gel erfolgte durch Ethidiumbromid (5 µg/ml) im Gel selbst. Die gefärbten DNA-Moleküle wurden auf einem UV-Transilluminator mit 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und mit einem Bilddokumentationssystem (Gel-Doc 1000; Bio-Rad) photographiert. Als Molekulargewichtsstandard diente in der Regel der 1 kb Molekulargewichtsmarker der Firma MBI Fermentas.

2.3.2.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden auf einem Transilluminator mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten und mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit der Firma PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) nach Angaben des Herstellers aus der Agarose extrahiert. Zur Elution der DNA von den Silica-Säulen wurde Wasser verwendet.

2.3.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki et al., 1989) wurde in einem Volumen von 30-50 µl in einem Thermocycler der Firma ABI durchgeführt. Von der zu untersuchenden Matrizen-DNA wurden zwischen 50 ng cDNA und 500 ng genomische DNA eingesetzt. Die dNTP's wurden in einer Konzentration von 0,25 mM verwendet. Beide Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol eingesetzt. Die verwendete Menge an Taq-Polymerase bzw. Pfu-Polymerase betrug 1 U. Als Puffer diente der 10 x PCR-Puffer der Firmen MBI Fermentas bzw. Invitrogen. Die PCR-Bedingungen wurden in der Regel folgendermaßen gewählt:

Initiale Denaturierung:	94°C für 5 min
Denaturierung:	94°C für 30 sec bis 1 min
Annealing:	55°C – 68°C für 30 sec
Elongation:	72°C für 1 min – 5min
Zyklenzahl:	35-40
Terminale Elongation:	72°C für 10 min

Bei der Amplifikation der Sphingosinkinase 1 der Ratte entfiel der Elongationsschritt.

2.3.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten für eine anschließende Sequenzierung erfolgte mit dem Nucleo Spin Extract II Kit (Macherey und Nagel, Düren) sofern es sich um ein einziges spezifisches PCR-Produkt handelte. Bei mehreren Amplifikaten im PCR-Ansatz wurden die definierten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des E.Z.N.A. Gel Extraction Kits der Firma PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) aus dem Gel extrahiert.

2.3.2.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von PCR-Produkten umfasste die Schritte der Ligation, der Transformation (siehe 2.1.8) der Plasmide in Bakterienzellen durch Hitzeschock und deren anschließende Vermehrung. Die erfolgreich transformierten Zellen wurden über ein im Vektorsystem integriertes Selektionssystem identifiziert und selektiv vermehrt, woraufhin die gesuchten DNA-Fragmente isoliert werden konnten.

Die Klonierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten erfolgte mit Hilfe der Plasmidvektoren pGEM-Teasy[®] (Promega), pCDNA 3.1 (Invitrogen), pEGFP-N1 (Clontech) und pGL3 basic (Promega) nach Angaben des Herstellers und nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989). Für die Ligation in pGEM-Teasy[®] wurden 100-250 ng des aufgereinigten PCR-Produktes mit 50 ng des mit einem 3'-terminalen Thymidinrest versehenen Vektors unter Verwendung von 3 U T4-DNA-Ligase (Promega) über Nacht bei 4°C ligiert. 0,1 Volumen des Ligationsansatzes wurde dann wie unter 2.1.8 beschrieben in chemokompetente XL-1-Blue-Bakterien transformiert. Im Falle der anderen Vektoren wurden die durch Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gewonnenen Fragmente in einer Konzentration von 100-250 ng mit 50 ng des ebenfalls mit den entsprechenden Endonukleasen geschnittenen Vektors unter Verwendung von 3 U T4-DNA-Ligase (Promega) über Nacht bei 4°C ligiert. Die Transformation erfolgte dann wie unter 2.1.8 beschrieben.

2.3.2.11 DNA-Sequenzierung

2.3.2.11.1 Sequenzierung von Plasmidvektoren und PCR-Produkten

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach einer Variation der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977). Als DNA-Matrize diente entweder ein PCR-Produkt, das auf einem Agarosegel eine einzelne Bande zeigte, oder aber Plasmidkonstrukte in den Vektoren pGEM-Teasy[®] (Promega), pCDNA 3.1 (Invitrogen), pEGFP-N1 (Clontech) und pGL3 basic (Promega). PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung mit dem Nucleo Spin Extract II Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Die Gewinnung reiner Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe des E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit der Firma PeqLab. Für die Sequenzierreaktion wurden 50-300

ng eines PCR-Produktes oder 200-500 ng eines Plasmids in einem Reaktionsvolumen von 10 µl verwendet. Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung eines der beiden jeweils verwendeten PCR-Primer. Plasmid-Vektoren wurden mit Standardprimern sequenziert. Eingesetzt wurden 10 pmol Primer und 4 µl „BigDye Premix“ des „ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Applied Biosystems). Es wurde folgendes Zwei-Stufen-Protokoll verwendet: 94°C für 15 Sekunden, 55°C für 4 Minuten in 25 Zyklen. Die Produkte wurden mit 90 µl Milli-Q-Wasser, 250 µl Ethanol abs. und 10 µl 4 M Natriumacetatlösung gefällt. Nach einer Zentrifugation von 20 min bei 4°C und 13.000 rpm wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend 5 min bei 37°C getrocknet. Nach Zugabe von 20 µl „template suppression reagent“ (Applied Biosystems) und einem Denaturierungsschritt von 2 min bei 92°C erfolgte die Auftrennung der Sequenzierprodukte auf 5%igen Polyacrylamidgelen mit 7M Harnstoff. Die Auswertung wurde durchgeführt mit dem Sequenzierautomaten ABI PRISM™ 3700 der Firma Applied Biosystems.

2.3.2.11.2 Computerunterstützte Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mittels der „Lasergene Sequence Analysis Software“ (DNASTAR Inc., USA). Alignments einzelner Sequenzen wurden entweder mit der Programmoption MEGALIGN des Lasergene-Programmpaketes oder mit dem frei verfügbaren Programm GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) durchgeführt. Datenbanksuchen erfolgten über das World Wide Web am „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit den Algorithmen blastn, tblastx (Altschul et al., 1990, 1997) und FASTA (Pearson, 1990) sowie am „Human Genome Sequencing Center“ des „Baylor College of Medicine“, USA, unter der folgenden Adresse: <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blasts/blasts.cgi>. Für die Recherche von konservierten Bindestellen verschiedener Transkriptionsfaktoren wurden die Programme mVista (<http://www.gsd.lbl.gov/vista/VistaInput.html>) zur Erstellung des Alignments und rVista (<http://teapot.jgi.org/ovcharen/rvista/index.html>) zur Analyse verwendet. Zusätzlich wurde die frei im Netz verfügbare Software von Genomatix (<http://www.genomatix.de>) für die Analyse des Promotors verwendet. Die Analyse auf Signalpeptide erfolgte mit den im Netz frei zugänglichen Programmen SignalP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-1.1>) und PSORTII (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/psort/psortII>).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

2.4.1.1 Gesamtzellextrakte (WCE)

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Zellrasen wurde nach der Stimulation mit PBS gewaschen, in 200 µl Lysispuffer (bez. auf eine 6-well-Platte) mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen durch 10 malige Passage durch eine 26G-Nadel mit 1 ml Spritze homogenisiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 4°C und 13.000 rpm wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Lysate bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.1.2 Zytoplasma- und Kernextrakte

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 14,5 cm. Die Zellen wurden nach Abnehmen des Kulturmediums zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 750 µl des hypotonischen Puffers A mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei 4°C und 10.000 rpm pelletiert. Der Überstand (zytoplasmatische Fraktion) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 100 µl des Hochsalzpuffers B resuspendiert, bei 4°C für 30 min auf einem Drehrad inkubiert und anschließend bei 4°C für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.4.2 Kolorimetrische Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976). Für die Standardkurve wurde zunächst ein BSA-Standard in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 bis 60 µg BSA in 800 µl Wasser vorgelegt. Von den Proteinextrakten wurden jeweils 10 µl in 790 µl Wasser gemessen. Nach Zugabe von 200 µl 5-fach BioRad-Farbkonzentrat wurden die Proben 5 min kräftig gemischt. Nach dem Pipettieren der jeweiligen Proben in eine ELISA-Platte wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration berechnet.

2.4.3 Proteinfällung

2.4.3.1 Trichloressigsäure-Präzipitation (TCA-Präzipitation)

Zur Fällung von Proteinen wurde zum Proteinextrakt oder dem Zellüberstand 10 % einer 70%igen Trichloressigsäure-Lösung zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten auf Eis, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt von 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen, abzentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das Pellet in 5 µl Tris/HCl (pH 8,5) aufgenommen und 45 µl 1 x SDS zugegeben. Falls die Lösung gelb war, wurde der pH mit 5 M NaOH eingestellt, bis der Markerfarbstoff blau war. Es folgte ein Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 95°C. Danach wurden die Proben abzentrifugiert und auf ein SDS-Gel geladen.

2.4.3.2 Immunpräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurde zwischen 30 und 50 µg Protein eingesetzt. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde 5 % FCS zugegeben, sowie der entsprechende erste Antikörper. Die Präzipitation wurde mit Lysispuffer auf ein Volumen von 100 bis 200 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde 20 µl Protein-A-Sepharose (für polyklonale Antikörper) zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rotieren inkubiert. Nachfolgend wurde die Sepharose durch kurzes Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert und nach Abnehmen des Überstandes je zweimal mit Niedrigsalz-Puffer und Hochsalz-Puffer gereinigt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit einer Hamiltonpipette getrocknet und 50 µl 1 x SDS-Probenpuffer zugegeben. Nach einer Denaturierung von 5 Minuten bei 95°C wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und wie unter 2.4.4 und 2.4.5 beschrieben weiter verfahren.

2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 1,5 mm dicke Tris-Glycin-Minigele (nach Laemmli, 1970) verwendet und jeweils 30-100 µg Protein auf 37,5 µl mit Lysispuffer verdünnt. Anschließend wurde 12,5 µl 4 x SDS mit DTT zugegeben und die Proben 5 min bei 95 °C denaturiert. 30 µl eines Proteinstandards (Firma PeqLab) wurden in die äußerste Geltasche aufgetragen. Für die Analyse der Sphingosinkinasen wurde ein 10%iges Gel verwendet; die Analyse der neutralen Ceramidase erfolgt mit 7%igen Gelen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V bis das Bromphenolblau 0,5 cm vom unteren Gelende entfernt war.

2.4.5 Elektrotransfer

Der Transfer der Proteine erfolgt nach der Methode des „Semi Dry Blot“ nach Kyhse-Andersen (1984). Dafür wurde eine Nitrocellulosemembran und 4 3MM-Papiere auf die Größe des Trenngeles zugeschnitten. Sowohl die 3MM-Papiere als auch die Membran wurden in Blottingpuffer getränkt. Der Blot selbst wurde wie folgt aufgebaut: ein 3MM-Papier, die Nitrocellulosemembran, das Trenngel, drei 3-MM-Papiere. Nach Auflegen der Elektroden erfolgte der Elektrotransfer in einer Blotapparatur (TransBlot SD; BioRad) für 1.5 Stunden bei 10 V. Nach dem Transfer wurden die Membranen in Wasser gespült und in Ponceau-S-Lösung 2 min zur Markierung der Proteinmarkerbanden gefärbt. Danach wurden die Membranen mit PBS wieder entfärbt. Anschließend folgte der immunochemische Nachweis der Proteine wie im nächsten Abschnitt beschrieben.

2.4.6 Immunochemischer Nachweis von Proteinen (Westernblot-Analyse)

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurden diese zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer 1%igen Milchpulverlösung inkubiert. Anschließend wurden die Reste dieser Lösung durch einmaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt und der Erstantikörper in Blockingpuffer angesetzt zugegeben. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte in der Regel über Nacht bei 4°C. Die jeweils verwendeten Verdünnungen der Erstantikörper sind unter 2.7.3 angegeben. Danach wurde 4 x 15 min in TNTX-Puffer gewaschen, gefolgt von einer einstündigen Inkubation des Zweitantikörpers in Blockingpuffer. Danach wurde wiederum für 4 x 15 min mit TNTX-Puffer gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit 0,2 ml/cm² ECL-Lösung (1:1 gemischt nach Herstellerangaben) für 1 min gleichmäßig benetzt, in Klarsichtfolie eingepackt und in die Filmkassette eingelegt. Der belichtete Röntgenfilm (Hyperfilm, MP) wurde automatisch in einer Entwicklermaschine (Hyperprocessor, Amersham) entwickelt. Zum Entfernen der gebundenen Antikörper wurde die Blotmembran zunächst mit Wasser für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend für weitere 10 min mit 2 ml/cm² „Stripping“-Puffer in einer Plastikschaale inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte von 2 x 5 min mit Wasser. Danach wurde die Membran wie oben beschrieben behandelt.

2.5 Bestimmung der Promotoraktivität

Zur Messung der Promotoraktivität wurde das Luciferase-Assay verwendet. Dazu wurden die jeweiligen Promotorfragmente sowie der Renilla-Kontrollvektor, wie unter dem Abschnitt „Transfektion von Säugerzellen“ beschrieben, zunächst in Mesangiumzellen transfiziert. Nachdem die Zellen für 12 Stunden in Hungermedium inkubiert worden waren, wurde der entsprechende Stimulus zugesetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das

Stimulationsmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem „Passive Lysis Buffer“ von Promega nach Herstellerangaben lysiert. Von diesem Lysat wurden jeweils 50 µl in entsprechende Luminometer-Röhrchen überführt. Die Detektion der Luciferase- und Renilla-Aktivitäten erfolgte mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay System der Firma Promega nach Herstellerangaben. Die Lichtemission wurde in einem Luminometer (Autolumat LB 953; EG&G Berthold) gemessen. Die gewonnenen Daten wurden nach folgender Formel gegeneinander abgeglichen, um die Promotoraktivität als relativen Luciferasewert (RLU) zu bestimmen:

$$\text{RLU} = \frac{\text{gemessener Firefly-Luciferasewert}}{\text{gemessener Renilla-Luciferasewert}} \times 100$$

2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit Hilfe einer „One way-Analyse der Varianz“ (ANOVA). Für mehrfache Vergleiche mit derselben Kontrollgruppe wurde die Signifikanzgrenze dividiert durch die Anzahl der Vergleiche gemäß Bonferroni.

2.7 Materialien

2.7.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Agar	GibcoLife Technologies, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniak, 25% (w/v)	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Aprotinin	Roche Biochemicals, Mannheim
ATP	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
γ -[³² P]ATP (9,25 MBq, 250 μ Ci/ml)	Amersham Pharmacia, Freiburg
bovines Serumalbumin, fettsäurefrei	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
bovines Serumalbumin, Fraktion V	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
1-Butanol	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
[¹⁴ C]-Ceramid	ICN Biomedicals, Eschwege
Chloroform	Merck Biosciences, Schwalbach
CGP 41251	Novartis Pharma, Basel, Switzerland
Coomassie-Brillant-Blue G250	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
α -[³² P]CTP (9,25MBq, 250 μ Ci)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Cycloheximid	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
DETA-NONOat	Alexis, Läufelingen, Switzerland
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Diolein	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen

Material und Methoden

Dithiothreitol	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
DMSO	Fisher Scientific, Loughborough
Dopamin	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
EGTA	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Ethanol	Merck Biosciences, Schwalbach
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Essigsäure	KMF optichem, Lohmar
Ficoll	Fluka, Schweiz
Flouromount-G	Southern Biotech, Birmingham, Alabama
Formaldehyd	Merck Biosciences, Schwalbach
Formamid	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
FTS (S-trans,trans-farnesylthiosalicysäure)	Merck Biosciences, Schwalbach
D-Galactonsäure γ -Lakton	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe
β -Glycerophosphat	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Griess-Ilosvay-Reagenz	Merck Biosciences, Schwalbach
Guanidinthiocyanat	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Hydroxylammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Insulin	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Interleukin-1 β	Novartis Pharma, Basel
IPTG	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Isoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Fluka, Schweiz
Kaliumchlorid	KMF optichem, Lohmar
Kanamycin-Monosulfat	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Leupeptin	Roche Biochemicals, Mannheim
LY29004 (2-(4-morpliny)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on)	Merck Biosciences, Schwalbach
N ^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA)	Merck Biosciences, Schwalbach
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen

Material und Methoden

Magnesium-ortho-Acetat	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Methanol, gradient grade für Chromatographie	Merck Biosciences, Schwalbach
Methanol	JT Baker, Deverten, Holland
(methyl- ^3H)-Thymidin (37MBq, 1mCi/ml)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Milchpulver	Naturaflor, Dietmannsried
Molekulargewichtsmarker (DNA)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Molekulargewichtsmarker (Protein)	PeqLab, Erlangen
MOPS	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat	AppliChem, Darmstadt
Natriumborat	Merck Biosciences, Schwalbach
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Tri-Natriumcitrat-dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Natriumfluorid	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck Biosciences, Schwalbach
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Natriumphosphat-Dihydrat	Merck Biosciences, Schwalbach
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
NP40	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Oligonukleotide	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Paraformaldehyd	Fluka, Schweiz
PDGF-BB	Hofmann La Roche, Basel
Pepstatin A	Roche Biochemicals, Mannheim
Pepton 140	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phosphatidylserin	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Propidiumiodidlösung	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Ro 31 8220 (Bisindolylmaleimid IX)	Calbiochem, Schwalbach

Material und Methoden

Salzsäure	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
SB 203580	Merck Biosciences, Schwalbach
γ -S-ATP	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
SDS	Roth, Karlsruhe
Sodiumlaurylsarcosyl	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
D- <i>erythro</i> -Sphingosin	Calbiochem, Schwalbach
Staurosporin	Merck Biosciences, Schwalbach
Suramin	Merck Biosciences, Schwalbach
TEMED	Fluka, Schweiz
TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Calbiochem, Schwalbach
Trichloressigsäure	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Trypton	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Tumor Nekrosefaktor α	Kindly provided by Knoll AG, Ludwigshafen
Tween 20	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4 [2-aminophenylthio]butadien)	Calbiochem, Schwalbach
Wasser, für Chromatographie	Merck Biosciences, Schwalbach
X-Gal	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Xylencyanol	Merck Biosciences, Schwalbach

2.7.2 Zellkulturreagenzien

β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
DMEM, 4500mg/l D-Glukose, + GlutaMax TM , -Pyruvat	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
fötale Kälberserum	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
fötale Kälberserum (Hyclone)	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
HEPES	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
L-Glutamin (200mM)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
MEM Natriumpyruvat (100mM)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
MEM Non-essential amino acids (100mM)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe

Material und Methoden

Natriumselenit-Pentahydrat	Merck Biosciences, Schwalbach
Penicillin-Streptomycin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Pferdeserum	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
RPMI 1640, + GlutaMax™	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Transferrin	Roche Biochemicals, Mannheim

2.7.3 Antikörper

Anti-β-Actin (Maus, monoklonal; 1:10000)	Sigma Aldrich Fine Chemicals, Deisenhofen
Anti-Green fluorescent protein (Maus, monoclonal, 1:750)	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-hSPHK1 (Kaninchen, polyclonal; 1:1000)	Eurogentec, Belgien: gegen zwei synthetische Peptide (CPSWKPQQMPPPEEPL und CPRGGK GALQLFRSH) basierend auf der Sequenz der humanen Sphingosinkinase 1 (Acc.No. AF266756)
Anti-Kaninchen-IgG (horseradish-peroxidase coupled, 1:3000)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Anti-Kaninchen-IgG (Alexa™ 488; 1:750)	Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande
Anti-Maus-IgG (horseradish-peroxidase coupled; 1:3000)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Anti-mSPHK1 (Kaninchen, polyclonal; 1:1000)	Eurogentec, Belgien: gegen ein synthetisches Peptid (CPRG LLPRPCRVLV) basierend auf der Sequenz der Sphingosinkinase 1 der Maus (Acc.No. NM_011451)
Anti-mSPHK2 (Kaninchen, polyclonal)	Eurogentec, Belgien: gegen zwei synthetische Peptide (TLLTG PAGQKPQA und PIAEGPPEMPASSGF) basierend auf der Sequenz der Sphingosinkinase 2 der Maus (Acc.No.NM_0200011)
Anti-Nucleolin (Maus, monoklonal; 1:1000)	Santa Cruz Inc., Heidelberg
Anti-rSPHK1 (Kaninchen, polyclonal; 1:1500)	Eurogentec, Belgien: 2 synthetische Peptide (CPRG LLPRPCRVLV und VADV DLESEKYRSLG) basierend auf der Sequenz der Sphingosinkinase 1 der Ratte (Acc.No. NM_133386)
Anti-phospho-rSPHK1 (Kaninchen, polyclonal: 1:1000)	Eurogentec, Belgien: gegen zwei synthetische Peptide (CCRQLSPM NLLS und RFTVGTFFRLAS) basierend auf der Sequenz der Sphingosinkinase 1 der Ratte (Acc.No.NM_133386)

2.7.4 Enzyme

Pfu-DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsenzyme	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Rnase A	QIAGEN Inc., Hilden
Taq-DNA Polymerase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

Material und Methoden

T4-DNA Ligase

Roche Biochemicals, Mannheim

2.7.5 Plasmidvektoren

pCDNA 3.1 Vektor

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pCR[®] 2.1-TOPO[®]

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pEGFP-N1 Vektor

BD Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgien

pGEM-T Easy Vektor

Promega GmbH, Mannheim

pGL3 basic Vektor

Promega GmbH, Mannheim

Renilla vector

Promega GmbH, Mannheim

2.7.6 Zelllinien

A293 (human embryonic kidney epithelial cells)

zur Verfügung gestellt von Prof. Harry Holthöfer, Helsinki, Finnland

hMC

zur Verfügung gestellt von Dr. Paul Gutwein, Pharmazentrum Frankfurt/Main

mMC, C57/Bl6 wt

Präparation von Primärzellen durch Dr. med. vet. Lotte Hofmann, Pharmazentrum Frankfurt/Main

mMC, C57/Bl6 hSPHK1 überexprimiert

Genoway, Lyon, Frankreich; Präparation von Primärzellen durch Dr. med. vet. Lotte Hofmann, Pharmazentrum Frankfurt/Main

mMC, C57/Bl6 mSPHK1^{-/-}

Genoway, Lyon, Frankreich; Präparation von Primärzellen durch Dr. med. vet. Lotte Hofmann, Pharmazentrum Frankfurt/

rMC, B1

Präparation von Primärzellen durch Prof. Dr. Josef Pfeilschifter, Pharmazentrum Frankfurt/Main

2.7.7 Kits / Assays / Transfektionsreagenzien / Standards

ABsolute Q-PCR Rox-Mix

ABgene, Hamburg

Bradford Protein Assay

BioRad, München

Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System

Promega GmbH, Mannheim

ECL Western Blot detection reagents

Amersham Pharmacia, Freiburg

Effectene[™] Transfektionsreagenz

QIAGEN Inc., Hilden

E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I

Qiagen, Erlangen

E.Z.N.A. Gel extraction Kit

Qiagen, Erlangen

First strand synthesis kit

MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

Lipofectamin[™] Transfektionsreagenz

Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

Oligofectamine™ Transfectionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker für DNA, 1kb ladder	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Molekulargewichtsmarker für Proteine	PeqLab, Erlangen
Nucleo Spin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
pGem TEasy Vector System I	Promega GmbH, Mannheim
Random Primed DNA Labeling Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
TOPO TA cloning® kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.7.8 Bakterienstämme

E. coli XL-1 blue	Stratagene, Heidelberg
-------------------	------------------------

2.7.9 Verbrauchsmaterialien

DC-Alufolien (20x20cm); Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
Hyperfilm Röntgenfilm	Amersham Pharmacia, Freiburg
Microtiterplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nick Columns; Sephadex G50 DNA grade	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipetten (Zellkultur)	Corning Incorporated, New York
ThermoFast 96 detection plates	ABgene, Hamburg
Trans Blot transfer medium (pure nitrocellulosemembrane; pore size 0,45µM/0,2µM)	BioRad, München
Transwell tissue culture treated polycarbonate membrane; 8µM pore size, 6,5mm Durchmesser	Corning Incorporated, New York
Ultra clear cap strips	Abgene, Hamburg
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-, 12- und 24-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zeta-Probe blotting membrane	BioRad, München

2.7.10 Oligonukleotide für die PCR

hSPHK1 (humane Sphingosinkinase 1)

hSK1a 1-rev	5'-gag tga gca tca gcg tga agg-3'
hSK1 prom 5-rev	5'-ggg agg ctt cgg cct caa act ttt c-3'
hSK1 f	5'-ccg acg agg act ttg tgc taa t-3'

Material und Methoden

hSK1 r 5'-gcc tgt ccc ccc aaa gca tta ac-3'

mSPHK1 (Sphingosinkinase 1 der Maus)

mSK1 f 5'-gcc acc ttc ttt cgc cta-3'

mSK1 r 5'-tgg aca gtc aag ttc cat atg c-3'

rSPHK1 (Sphingosinkinase 1 der Ratte)

EcoRI rSK 1 5'-ggg gaa ttc atg caa cca gca gac tgt cc-3'

NotI rSK 1 5'-caa cgc ggc cgc tca tat tgg ttc ttc tgg-3'

EcoRI rSK 1 oSt r 5'-ggg gaa ttc tat tgg ttc ttc tgg agg-3'

XhoI rSK 1f 5'-cgc ctc gag atg caa cca gca gac tgt cc-3'

rSK 1cds f 5'-atg caa cca gca gac tgt cc-3'

rSK 1cds r 5'-tca tat tgg ttc ttc tgg agg-3'

rSpK1 cds 1f 5'-cta gca agc ctg cgc-3'

rSpK1 cds 1r 5'-gcg cag gct tgc tag-3'

rSK 1cds 2f 5'-atg caa cca gca gac tgt cc-3'

rSK 1cds 2r 5'-tca tat tgg ttc ttc tgg agg-3'

rSK 1cds 3f 5'-cat gtc cgg tga cgg-3'

rSK 1cds 3r 5'-gca ggt atc tta gag-3'

KpnI 1c f 5'-ggg aat tcg gta ccg tag agg cag gag gat c-3'

XhoI 1c r 5'-cgc ctc gag ccc ggg ccg act ttt cta g-3'

KpnI 1a f 5'-ggg aat tcg gta ccg atg ggg gag gtg aac-3'

XhoI 1a r 5'-cgc ctc gag caa cca acc aac c-3'

KpnI 1de f 5'-ggg aat tcg gta ccg gtt ggt tgt ttc cg-3'

XhoI 1de r 5'-cgc ctc gag cga tcc tca cca act g-3'

KpnI 1f f 5'-ggg aat tcg gta ccc tgg gtt cct cca g -3'

XhoI 1f r 5'-cgc ctc gag ggc gca gcc cag-3'

KpnI 1start f 5'-ggg aat tcg gta ccg gct gcg ccc tca c-3'

XhoI 1start r 5'-cgc ctc gag cat agc gtc ccg-3'

KpnI 500 for 5'-ggg aat tcg gta ccg tac ttg gcc tcc cag-3'

KpnI 1000 for 5'-ggg aat tcg gta ccc tag cat gag gtg gg-3'

KpnI 1500 for 5'- ggg aat tcg gta cct aga agg tag tgc -3'

KpnI 2500 for 5'-ggg aat tcg gta ccg aag ttg ggc gca gtg-3'

Material und Methoden

Kpnl 3000 for	5'-ggg aat tcg gta ccg gat gga agc tca ag-3'
rSK 1 Erk f	5'-ctg tta tgc tgc cgg cag ctg gcg ccc atg aat ctg ctg tcc ctg-3'
rSK 1 Erk r	5'-cag gga cag cag att cat ggg cgc cag ctg ccg gca gca taa cag-3'
rSK 1 PKC f	5'-gag att cgt ttc acg gtg gga gct ttt ttt cgc cta gca agc ctg-3'
rSK 1 PKC r	5'-cag gct tgc tag gcg aaa aaa agc tcc cac cgt gaa acg aat ctc-3'
rSK1 Ser255 f	5'-ggc tgc ctc taa gat acc tgc cgc ggc act ggc aca gaa ggg ccc-3'
rSK1 Ser225 r	5'-ggg ccc ttc tgt gcc agt gcc gcg gca ggt atc tta gag gca gcc-3'

rSPHK 2 (Sphingosinkinase 2 der Ratte)

rSK 2 HindIII f	5'-ggg aac ctt atg gcc cca cca cca cta ctg-3'
rSK 2 EcoRI r	5'-ggg gaa ttc tca ttc agg ctc gag gct ttt g-3'
rSK 2 EcoRI ss r	5'-ggg gaa ttc ttc agg ctc gag gct ttt g-3'
rSK 2 f	5'-atg gcc cca cca cca cta ctg-3'
rSK 2 r	5'-cag ctt □a gaga tca tgg-3'

Sonstige Primer

GAPDH f	5'-aat gca tcc tgc acc acc aa-3'
GAPDH r	5'-gtc att gag agc aat gcc agc-3'
M13 reverse	5'-cag gaa aca gct atg acc-3'
SP6	5'-cat tta ggt gac act ata g-3'
T7	5'-taa tac gac tca cta tag gg-3'
pEGFP N1 for	5'-gtc gta aca act ccg ccc-3'
pEGFP N1 rev	5'-gtc cag ctc gac cag gat g-3'
pGL3 for	5'-cta gca aaa tag gct gtc cc-3'
pGL3 rev	5'-ctt tat gtt ttt ggc gtc ttc c-3'

2.7.11 siRNA-Oligonukleotide

hscr	5'-CUG GUU ACG AAG CGA AUC CdT-3'
hSPHK1	5'-GGG CAA GGC CUU GCA GCU CUUdT-3'
hSPHK2	5'-GCC GCA GCC CCU CAG ACU CdT-3'
rSAH2	5'- AAA GCC UGC UGU CAU ACR AdT-3'
rSPHK1	5'-CAG CUU CUU UGA ACU ACU AdT-3'
rSPHK2	5'-UGU CCU UCA ACC UCA UAC AdT-3'

2.7.12 Taqman-Sonden

rSPHK1	Rn00591307_m1, (Applied Biosystems)
rSPHK2	Rn01457923_g1, (Applied Biosystems)
eukaryotische 18 sRNA (endogene Kontrolle; VIC/TAMRA)	Nr. 4310893E, (Applied Biosystems)

2.7.13 Puffer und Lösungen

Blockierungspuffer (Western Blot)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl, 0,2% Triton-X-100, 3% BSA, 10% Pferdeserum
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 190 mM Glycin, 20% Methanol
Ceramidasepuffer (neutral)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,5% Triton-X-100, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 5 mM D-Galactonic acid γ -Lakton, 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Pepstatin A, 10 μ g/ml Aprotinin, 1 mM PMSF
DAPI-Lösung (Migration)	1 μ g/ml DAPI in 100% Methanol
deionisiertes Formamid	100 ml Formamid, 1 g Amberlyte; 1h rühren; über Filter aufreinigen
DNA-Ladepuffer (5 x)	50% Glycerin, 20 mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol
Fixierlösung (MAPK-/PKC-Assay)	Milli-Q-Wasser:Isopropanol:Eisessig (65:25:10)
Hochsalzpuffer (IP)	50 mM Tris (pH 7,4), 500 mM NaCl, 0,2% Triton-X-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,1% SDS
Hungermedium (rMC, HEK, PC12)	500 ml DMEM, 50 mg BSA; sterilfiltrieren
Hungermedium (hMC)	500 ml DMEM, 5 ml FCS; sterilfiltrieren
Hungermedium (mMC)	500 ml DMEM, 5 ml FCS, 225 μ l 10mM β -Mercaptoethanol, sterilfiltrieren
IPTG-Stock (100 mM)	238 mg IPTG in 10ml deionisiertem Wasser
Laufmittel Ceramidaseassay	Chloroform: Methanol: NH ₃ (90:20:0,5)
Laufmittel Kinaseassay	1-Butanol: Ethanol: Essigsäure: Wasser (80:20:10:20, v/v)
Laufpuffer (5 x; SDS-Gel)	60,4 g Tris, 3,72 g EDTA, 10 g SDS, 285,2 g Glycin ad 2 l Milli-Q-Wasser
LB-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 15 g Agar
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid; pH 7,0
Lysispuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 1% Triton X 100; 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 40 mM β -Glycerophosphat, 50 mM Natriumfluorid, 10 mM Natriumpyrophosphat, 200 μ M Natriumorthovanadat, 2 mM DTT, 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Pepstatin A, 10 μ g/ml Aprotinin, 1 mM PMSF
MAPK Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EGTA, 2 mM MnCl ₂ , 01 mM Na ₃ VO ₄ , 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Pepstatin A, 10 μ g/ml Aprotinin, 1 mM PMSF
Medium für HEK-Zellen	500 ml DMEM, 50 ml FCS, 5 ml PenStrep

Material und Methoden

Medium für humane Mesangiumzellen	500 ml RPMI 1460, 50 ml FCS, 5 ml PenStrep, 5 ml HEPES (pH 7), 5 ml non-essential amino acids (100 mM), 5 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml Natriumpyruvat (100 mM), 6 mg Insulin, 100 µL Transferrin, 0,6 µl Natriumselenit (50 µg/ml)
Medium für Mausmesangiumzellen	500 ml RPMI 1460, 75 ml FCS, 5 ml PenStrep, 5 ml HEPES (pH 7), 6 mg Insulin, 225 µL β-Mercaptoethanol (10 mM), 100 µL Transferrin, 0,6 µl Natriumselenit (50 µg/ml)
Medium für Rattenmesangiumzellen	500 ml RPMI 1460, 50 ml FCS, 5 ml PenStrep, 5 ml HEPES (pH 7), 6 mg Insulin, 100 µL Transferrin, 0,6 µl Natriumselenit (50 µg/ml)
Methylenblau-Lösung	0,1 g Methylenblau, 20,5 g Natriumacetat ad 500 ml MQ-Wasser
Natronlauge (1 M)	40,01 g Natronplätzchen auf 1 l Milli-Q-Wasser
Niedrigsalzpuffer(IP)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,2% Triton-X-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,1% SDS
PBS (5 x)	20 g NaCl, 11,75 g NaH ₂ PO ₄ , 51,62 g Na ₂ HPO ₄ ad 1 l Milli-Q-Wasser
Permeabilisierungslösung	0,1 % (v/v) Triton X-100 in 0,1 % (w/v) Trinatriumcitrat-Dihydrat, pH 7,0
2 x PKC-Kinasepuffer	40 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgOAc, 1 mM CaCl ₂ , 2 mM DTT; Lagerung bei -20°C
PL-Mix	50 µg/ml Phosphatidylserin, 5 µg/ml Diolein
Ponceau S-Lösung	0,2 g Ponceau S, 3 g Trichloressigsäure ad 100 ml Milli-Q-Wasser
10 x Propidiumiodidlösung	500 µg/ml in 10 ml Tris-HCl, pH 7,5
Puffer A (zytosolischer Extrakt)	20 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM EDTA, 0,2% NP40, 10% Glycerin, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF (frisch zugesetzt) ad 50 ml Milli-Q-Wasser
Puffer B (Kernextrakt)	420 mM NaCl, 20% Glycerin, 20 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM EDTA, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF (frisch zugesetzt) ad 50 ml Milli-Q-Wasser
Salzlösung (LC/MS/MS)	0,74% KCl (v/v), 0,04% CaCl ₂ (v/v), 0,034% MgCl ₂ (v/v)
SDS-Ladepuffer (4 x)	100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10% Glycerin, 5% SDS, 1% Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol
SDS-Sammelgelpuffer	30,28 g Tris, 10 ml 20% SDS ad 500 ml Milli-Q-Wasser; einstellen auf pH 6,8 mit konz. HCl
SDS-Trenngelpuffer	90,85 g Tris, 10 ml 20% SDS ad 500 ml Milli-Q-Wasser; einstellen auf pH 8,8 mit konz. HCl
Sphingosinkinase 1-Puffer (Kinaseassay)	20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 20% Glycerin, 1mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 40 mM β-Glycerophosphat, 15 mM Natriumfluorid, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF
Sphingosinkinase 2-Puffer (Kinaseassay)	20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 20% Glycerin, 1mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 40 mM β-Glycerophosphat, 15 mM Natriumfluorid, 1 mM KCl, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF
Substratlösung Kinaseassay	1 mM D-erythro-Sphingosine (in Ethanol puris.), 4 mg/ml BSA in PBS

Material und Methoden

TBE-Puffer (10 x)	108g Tris, 55g Borat, 40ml 0,25M EDTA-Lösung ad 1 l Milli-Q-Wasser
TFBI-Puffer (komp. Zellen)	30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 15% Glycerin; einstellen auf pH 5,8 mit Essigsäure; sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C
TFBII-Puffer (komp. Zellen)	10 mM MOPS (pH 7), 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl ₂ , 15% Glycerin; sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C
TNTX-Puffer (10 x; Western Blot)	500 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 M NaCl, 2% Triton-X-100
Trichloressigsäure (5%)	50 g Trichloressigsäure auf 1 l Milli-Q-Wasser
Trichloressigsäure (70% ; TCA-Fällung)	70 g Trichloressigsäure auf 100 ml Milli-Q-Wasser
X-Gal Stock (40 mg/ml)	400 mg X-Gal in 10 ml Dimethylformamid

3. Ergebnisse

3.1 Effekte der extrazellulär applizierten Nukleotide auf die Sphingosinkinasen und die neutrale Ceramidase

In der Literatur sind zahlreiche Beispiele für biologische Prozesse beschrieben, die durch extrazelluläre Nukleotide reguliert werden können. Dazu zählen unter anderem die Kontraktion von glatten Muskelzellen, die Aggregation von Blutplättchen, Neurotransmission, Immunantworten, Entzündungsreaktionen und Schmerzwahrnehmung (Boarder and Hourani, 1998; Ralevic and Burnstock, 1998; Abbracchio et al., 2006). In renalen Mesangiumzellen konnte ebenfalls eine Reihe von Prozessen beschrieben werden, die durch extrazelluläre Nukleotide gesteuert werden. Besonders bedeutsam in diesem Zusammenhang ist die Steigerung der Proliferation (Schulze-Lohoff et al., 1992; Huwiler and Pfeilschifter, 1994), die zum Verlauf einer Glomerulonephritis beitragen könnte, sowie der Schutz der Zellen vor stressinduzierter Apoptose (Huwiler et al., 2002). Die Expression der verschiedenen Subtypen von Purinrezeptoren auf der Oberfläche der Mesangiumzellen wurde bereits auf mRNA-Ebene untersucht und nachgewiesen (Bailey et al., 2000; Leipziger, 2003, Schwiebert and Kishore, 2001).

Da die extrazellulären Nukleotide ATP und UTP nachweislich um ein Vielfaches stärkere Mitogene sind als beispielsweise PDGF, wurde im Rahmen dieser Dissertation die Wirkung der extrazellulären Nukleotide auf die Aktivität wichtiger Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels näher untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung der Wirkung dieser Nukleotide auf die neutrale Ceramidase und die beiden Orthologe Sphingosinkinase 1 und 2. In der Literatur finden sich zahlreiche Belege für die Wichtigkeit dieser Enzyme bei der Regulation einer Reihe von zellulären Prozessen durch Bildung von bioaktiven Lipiden, allen voran der Regulation der Apoptose, insbesondere durch Ceramid, und der Proliferation, vor allem durch Sphingosin-1-Phosphat. Aus diesem Grund wurden Mesangiumzellen der Ratte zunächst mit verschiedenen Nukleotiden und Nukleotidanalogen stimuliert und nach der Proteinextraktion die Aktivitäten der Sphingosinkinasen 1 und 2 (rSPHK 1 und rSPHK 2) sowie der neutralen Ceramidase (rASAH 2) *in vitro* untersucht. Im Anschluss daran wurde die Rolle insbesondere der Sphingosinkinase 1 für die Regulation einiger wichtiger zellulärer Antworten, insbesondere der Migration und der Proliferation, in den Mesangiumzellen unter Verwendung von siRNA und Sphingosinkinase 1-defizienter Mausmesangiumzellen näher untersucht.

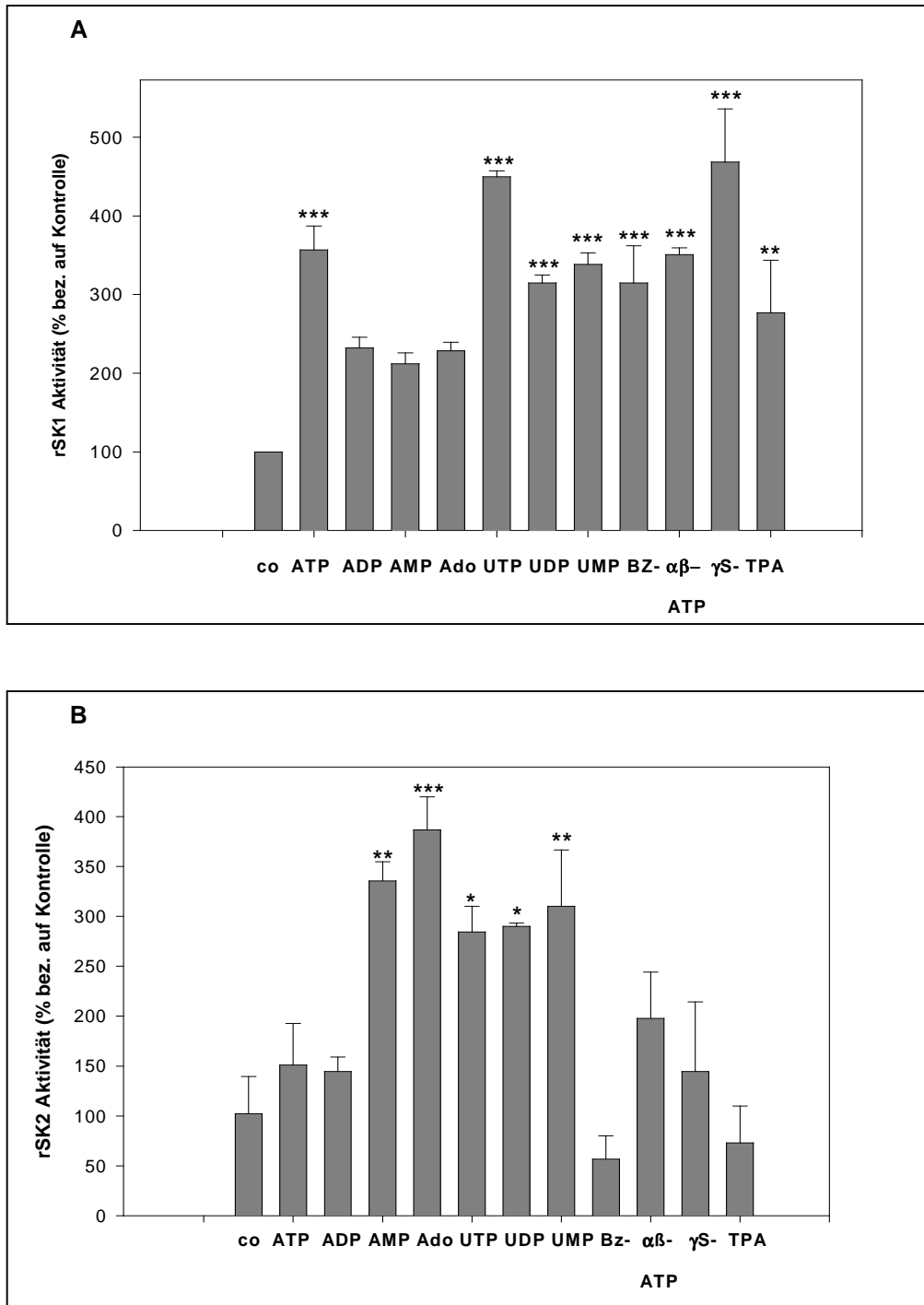


Abb. 9: Effekt extrazellulär applizierter Nucleotide auf die Aktivität von rSPHK 1 und rSPHK 2

Ruhende Mesangiumzellen wurden für 20 h mit je 100 μM ATP, ADP, AMP, Adenosin (Ado), UTP, UDP, UMP, Bz-ATP, $\alpha\beta$ -me-ATP, γS -ATP oder mit TPA (100 nM) stimuliert. Für die Aktivitätsassays wurde je 50 μg Protein eingesetzt. Die Aktivitätsdaten der rSPHK 1 (Abb. 9A) und der rSPHK 2 (Abb. 9B) sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=6$, Abb. 9A; $n=3$ bei Abb. 9B). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

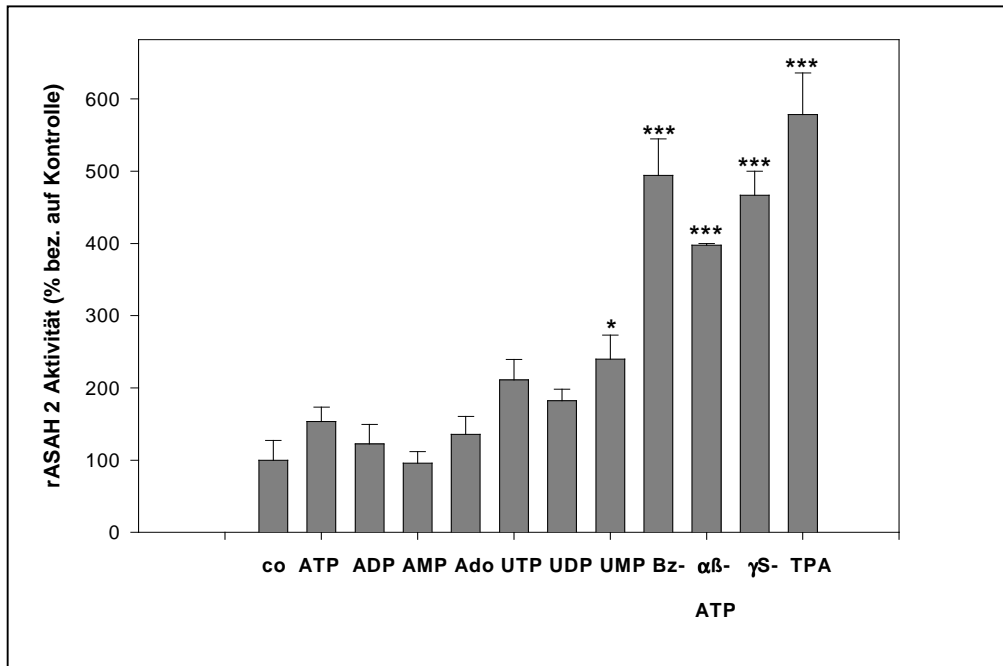


Abb. 10: Effekt extrazellulär applizierter Nucleotide auf die Aktivität von rASAH 2

Ruhende Mesangiumzellen wurden für 20 h mit je 100 μ M ATP, ADP, AMP, Adenosin (Ado), UTP, UDP, UMP, Bz-ATP, $\alpha\beta$ -me-ATP, γ S-ATP oder mit TPA (100 nM) stimuliert. Der Aktivitätsassay wurde mit je 50 μ g Protein durchgeführt. Die Aktivitätsdaten der neutralen Ceramidase sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). *p<0.05, ***p<0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

Eine signifikante Steigerung der Aktivität der Sphingosinkinase nach 20-stündiger Stimulation konnte mit einer Reihe von Nucleotiden und Nucleotidanalogen nachgewiesen werden (Abb. 9A). Als besonders potent erwiesen sich dabei vor allem ATP und sein stabiles Analogon γ S-ATP, sowie UTP und eine Reihe von Abbauprodukten von UTP. Im Gegensatz dazu zeigten die Abbauprodukte von ATP nur eine schwache, nicht signifikante Induktion der Aktivität der Sphingosinkinase 1. Auch die Aktivität der Sphingosinkinase 2 kann durch Nucleotide und deren Analoga modifiziert werden (Abb. 9B). Allerdings zeigen sich dabei deutliche Unterschiede im Aktivierungsmuster im Vergleich zur Sphingosinkinase 1. Die Sphingosinkinase 2 wird am stärksten durch Adenosin aktiviert, gefolgt von AMP, sowie UTP und seinen Abbauprodukten. ATP hat keinerlei signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Sphingosinkinase 2. Die Aktivität der neutralen Ceramidase (Abb. 10) wird am stärksten durch TPA, aber auch durch Benzoyl-ATP (Bz-ATP), $\alpha\beta$ -Me-ATP und γ S-ATP erhöht. Darüber hinaus ist eine signifikante Aktivierung auch mit UMP zu beobachten. Die hier beobachteten Effekte auf die Aktivitäten vor allem der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase wurden im Folgenden näher untersucht.

3.1.1 Wirkung von ATP auf die Aktivität der Sphingosinkinase 1

In einer nächsten Versuchsreihe wurde die durch ATP induzierte Proteinexpression der Sphingosinkinase 1 durch Zeitkinetik- und Dosis-Wirkungsexperimente weiter charakterisiert. Dazu wurden die Mesangiumzellen, wie in Abbildung 11 beschrieben, behandelt und anschließend durch Aktivitätsassays die Aktivität der Sphingosinkinase 1 ermittelt.

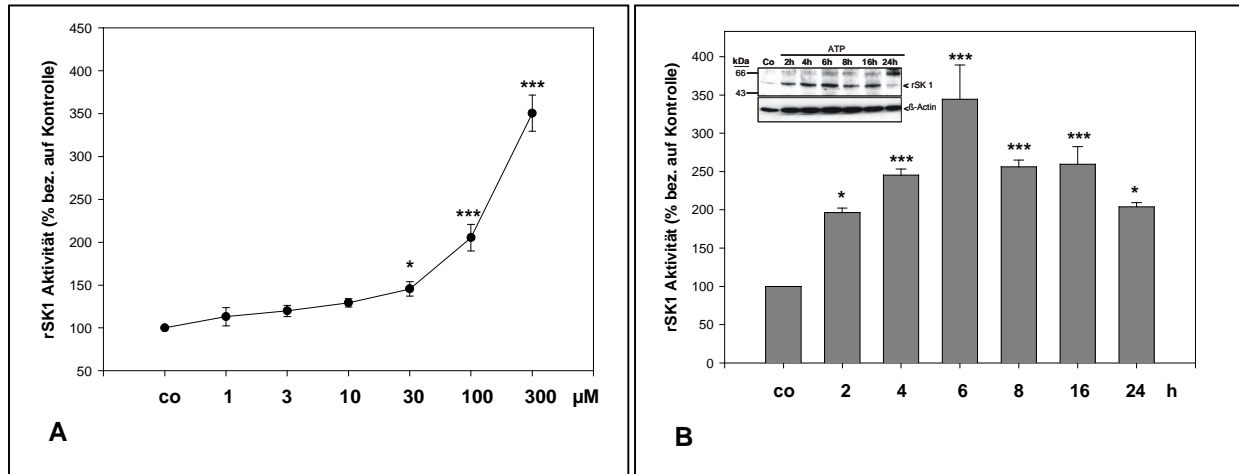


Abb. 11: Veränderung der Proteinexpression und Erhöhung der Aktivität der rSPHK 1 durch ATP

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit den angegebenen ATP-Konzentrationen in µM 24 Stunden inkubiert (Abb. 11A) oder mit 100 µM ATP für die angegebene Zeitdauer stimuliert (Abb. 11B). Für die Westernblot-Analyse (Abb. 11B kleines Bild) wurden je 100 µg Protein, für die Aktivitätsassays je 50 µg Protein eingesetzt. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=6). *p<0.05, ***p<0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

Wie die Abbildung 11A zeigt, ist die Aktivierung der Sphingosinkinase 1 abhängig von der verwendeten Konzentration von ATP. Eine signifikante Aktivitätssteigerung kann bereits mit einer ATP-Konzentration von 30 µM erreicht werden. Die höchste Aktivierung des Enzyms zeigt sich mit einer ATP-Konzentration von 300 µM. Da bei diesen hohen Konzentrationen jedoch unselektiv auch die ionotropen P2X-Rezeptoren aktiviert werden können, wurden für die nachfolgenden Experimente 100 µM ATP verwendet, falls nicht anders angegeben. Die Abbildung 11B zeigt darüber hinaus deutlich, dass die Aktivität auch in Abhängigkeit von der Zeit ansteigt und bereits nach 2 Stunden Inkubationszeit eine signifikante Aktivitätssteigerung der Sphingosinkinase 1 auftritt. Die maximale Aktivierung ist nach ca. 6 Stunden zu beobachten und nimmt danach langsam wieder ab, ohne jedoch nach 24 Stunden den Kontrollwert zu erreichen. Die beobachtete Aktivitätszunahme geht dabei mit einer höheren Proteinexpression der Sphingosinkinase 1 einher (Abb. 11B, kleines Bild).

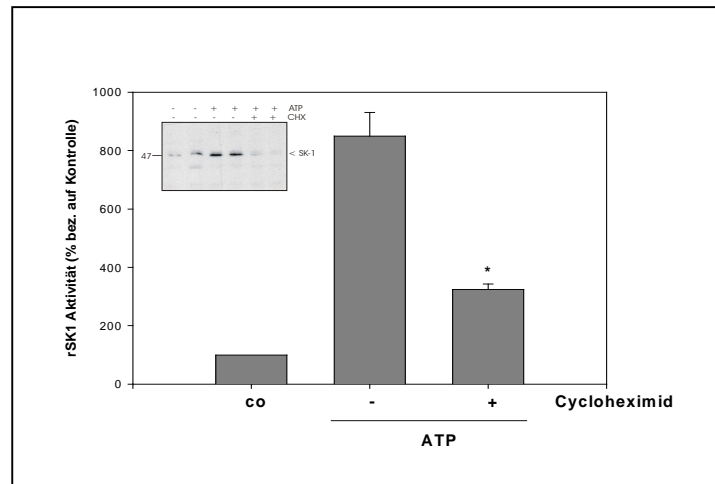


Abb. 12: Veränderung der Proteinexpression der rSPHK 1 durch ATP

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit 100 ng/ml Cycloheximid in Anwesenheit von 100 μ M ATP inkubiert und nach sechs Stunden geerntet. Für die Westerblot-Analyse (kleines Bild) wurden je 100 μ g Protein, für das Aktivitätsassay je 50 μ g Protein eingesetzt. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). *p<0.05 wurde als statistisch signifikant bezogen auf den ATP-stimulierten Wert angesehen.

Durch Inkubation der Mesangiumzellen mit 100 ng/ml Cycloheximid, welches die *de novo* Proteinsynthese hemmt, kann zum einen die durch ATP induzierbare Steigerung der Aktivität der Sphingosinkinase 1 blockiert werden (Abb. 12). Zum zweiten kann durch die Verwendung von Cycloheximid auch die durch ATP induzierte Neusynthese des Proteins signifikant blockiert werden (Abb. 12, kleines Bild). Damit liegt es nahe zu vermuten, dass eine Aktivierung des Promotors der Sphingosinkinase 1 in den Mesangiumzellen der Ratte durch ATP vorliegt, die über die Modulation des mRNA-Spiegels und der Aktivierung der *de novo* Proteinsynthese Einfluss ausübt auf die Gesamtkonzentration des Proteins in der Zelle. Dies soll zu einem späteren Zeitpunkt weiter diskutiert werden.

3.1.2 Wirkung von UTP auf die Aktivität der Sphingosinkinase 1

Da bereits gezeigt werden konnte, dass ATP in der Lage ist, die Proteinexpression und damit die Aktivität der Sphingosinkinase 1 in Mesangiumzellen der Ratte zu beeinflussen, sollte in einem weiteren Versuch auch die Wirkung von UTP untersucht werden, da es sich dabei ebenfalls um einen Liganden an bestimmten Purinrezeptoren (P2Y-Rezeptoren) handelt.

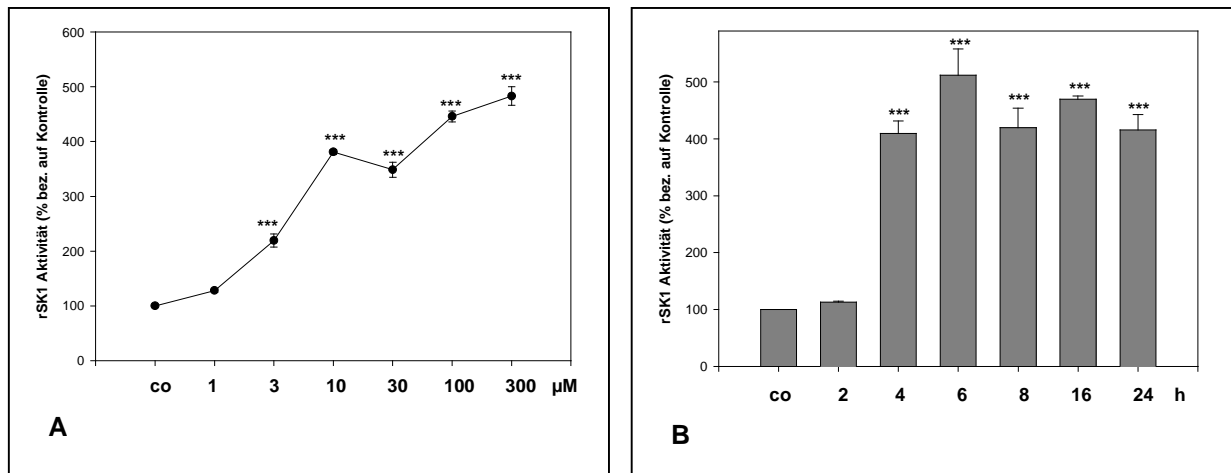


Abb. 13: Wirkung von UTP auf die Proteinexpression und Aktivität der rSPHK 1

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit unterschiedlichen UTP-Konzentrationen 24 Stunden inkubiert (Abb. 13A) oder mit 100 µM UTP für die angegebenen Zeiten stimuliert (Abb. 13B). Für die Aktivitätsassays wurden je 50 µg Protein eingesetzt. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=6). ***p<0.001 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

Abbildung 13A zeigt, dass auch UTP in einer dosisabhängigen Art und Weise in der Lage ist, die Aktivität der Sphingosinkinase 1 in den Mesangiumzellen zu stimulieren. Dabei kann bereits, im Gegensatz zur Stimulation mit ATP, mit einer Dosis von 3 µM UTP eine signifikante Aktivitätssteigerung erzielt werden. Die höchste Aktivierung des Enzyms kann ebenfalls mit 300 µM UTP erreicht werden. Für die nachfolgenden Experimente wurde jedoch ebenfalls nur 100 µM UTP verwendet, falls nicht anders angegeben. Im Gegensatz zur Wirkung von ATP, die bereits nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität der Sphingosinkinase 1 in den Mesangiumzellen führt, tritt dieser Effekt bei einer Stimulation mit UTP leicht verzögert erst nach einer Stimulationsdauer von ca. vier Stunden auf (Abb. 13B). Die maximale Aktivierung der Sphingosinkinase 1 ist auch im Falle einer Stimulation mit UTP nach ca. sechs Stunden Inkubationsdauer zu beobachten und bleibt über die nachfolgenden 24 Stunden auf vergleichbar hohem Niveau. Auch die Koinkubation von UTP mit Cycloheximid führt zu einer Reduktion der Aktivitätssteigerung der Sphingosinkinase 1 und zu einer Verringerung der Proteinexpression der Sphingosinkinase 1 (ohne Abbildung).

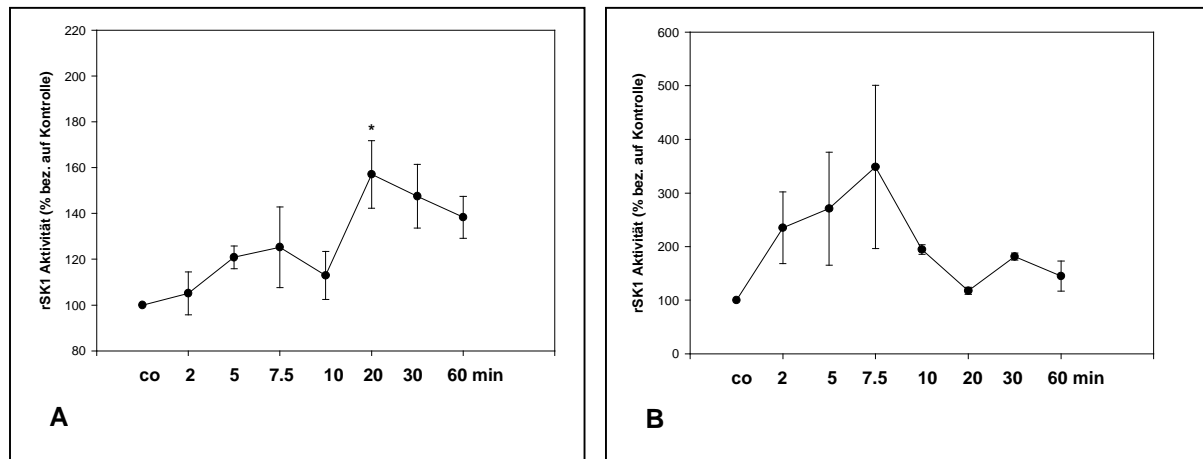


Abb. 14: Erhöhung der Aktivität der rSPHK 1 nach Kurzzeitstimulation

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit 300 μ M ATP (Abb. 14A) oder UTP (Abb. 14B) für den angegebenen Zeitraum stimuliert. Für das Aktivitätsassay wurde je 50 μ g Protein eingesetzt (Abb. 14A/B). Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). * $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

Wie die Abbildung 14 zeigt, führt die Stimulation vor allem mit UTP (Abb. 14B) bereits nach wenigen Minuten zu einer, wenn auch nicht signifikanten, Erhöhung der Aktivität der Sphingosinkinase 1. Einen zeitlich etwas versetzten Aktivitätsanstieg kann man auch mit ATP beobachten (Abb. 14A). Diese kurzzeitige Aktivitätserhöhung der Sphingosinkinase 1 kann jedoch nicht auf eine Proteinneusynthese zurückgeführt werden, da die Inkubationsdauer dafür zu kurz ist. Stattdessen beruht dieser Effekt vermutlich auf einer posttranslationalen Modifikation der Sphingosinkinase 1. Am wahrscheinlichsten handelt es sich dabei um eine Phosphorylierung durch eine Proteinkinase wie z.B. die MAPK. Ein solcher Mechanismus konnte kürzlich von Pitson et al. (2003) für die humane Sphingosinkinase 1 beschrieben werden. Von entscheidender Bedeutung ist bei diesem Enzym die Phosphorylierung zweier MAPK-Phosphorylierungsstellen durch ERK1/2. Die Überprüfung der Aminosäuresequenz der Sphingosinkinase 1 der Ratte zeigt sowohl mögliche ERK- als auch PKC-Phosphorylierungsstellen. Interessant in diesem Zusammenhang erscheinen daher weitergehende Untersuchungen dieser Phosphorylierungsstellen mit Hilfe von Phosphorylierungsmutanten, die mit den entsprechenden *in vitro* Phosphorylierungsassays auf ihre Funktionalität untersucht werden könnten.

3.1.3 Regulation der durch ATP und UTP induzierten rSPHK 1-Aktivität

Um die Signalwege näher zu untersuchen, die bei der Induktion der chronischen Aktivität der Sphingosinkinase 1 durch extrazelluläre Nukleotide eine Rolle spielen, wurde eine Reihe von Hemmstoffen verwendet, die verschiedene Signaltransduktionskaskaden in der Zelle blockieren können. In einer ersten Versuchsreihe wurde Suramin verwendet. Obwohl diese Substanz ein relativ unspezifischer Hemmstoff ist, konnte gezeigt werden, dass Suramin den P2Y₂-Rezeptor antagonisieren kann, während der P2Y₄-Rezeptor durch Applikation von Suramin nicht blockierbar ist.

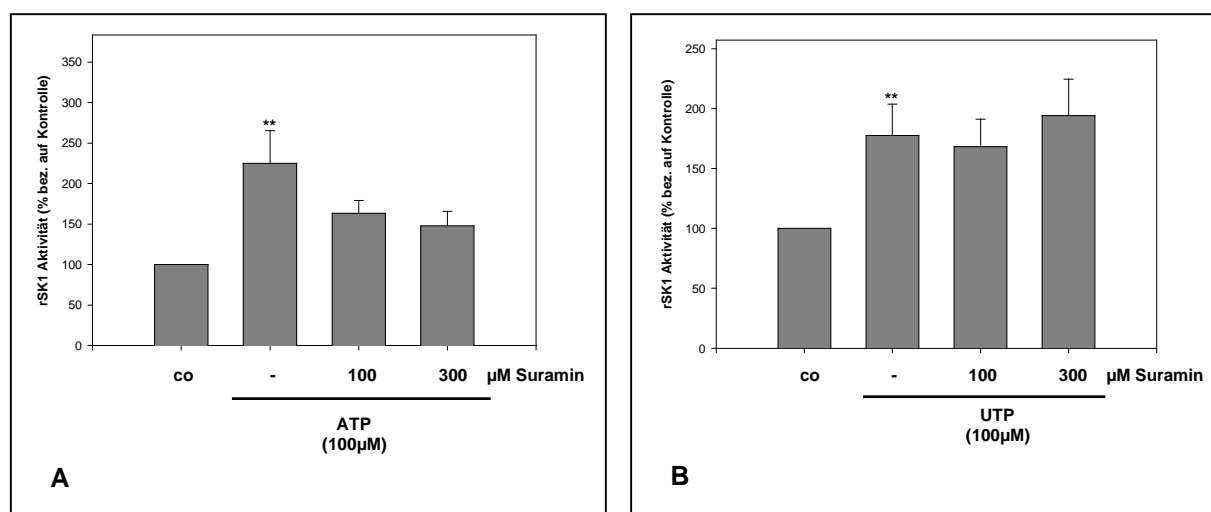


Abb. 15: Effekt von Suramin auf die rSPHK 1-Aktivität

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit 100 μM bzw. 300 μM Suramin für 30 Minuten präinkubiert und anschliessend mit 100 μM ATP (Abb. 15A) oder UTP (Abb. 15B) für 16 Stunden stimuliert. Für die Aktivitätsassays wurden je 50 μg Protein eingesetzt. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=3). **p < 0.01 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

Wie die Abbildung 15A zeigt, kann die durch ATP induzierte Aktivitätssteigerung der Sphingosinkinase 1 durch Suramin geringfügig reduziert werden. Die Applikation von Suramin hatte auf die durch UTP induzierte Steigerung der Aktivität der Sphingosinkinase 1 in den Mesangiumzellen keinerlei Einfluss (Abb. 15B). Diese Daten könnten darauf hindeuten, dass ATP und UTP über verschiedene P2-Rezeptoren wirken. Da P2Y-Rezeptoren alle G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind, wurde weiterhin untersucht, ob Pertussistoxin, ein Hemmstoff von inhibitorischen G_{i/o}-Proteinen, in der Lage ist, die ATP- und UTP-Effekte zu beeinflussen.

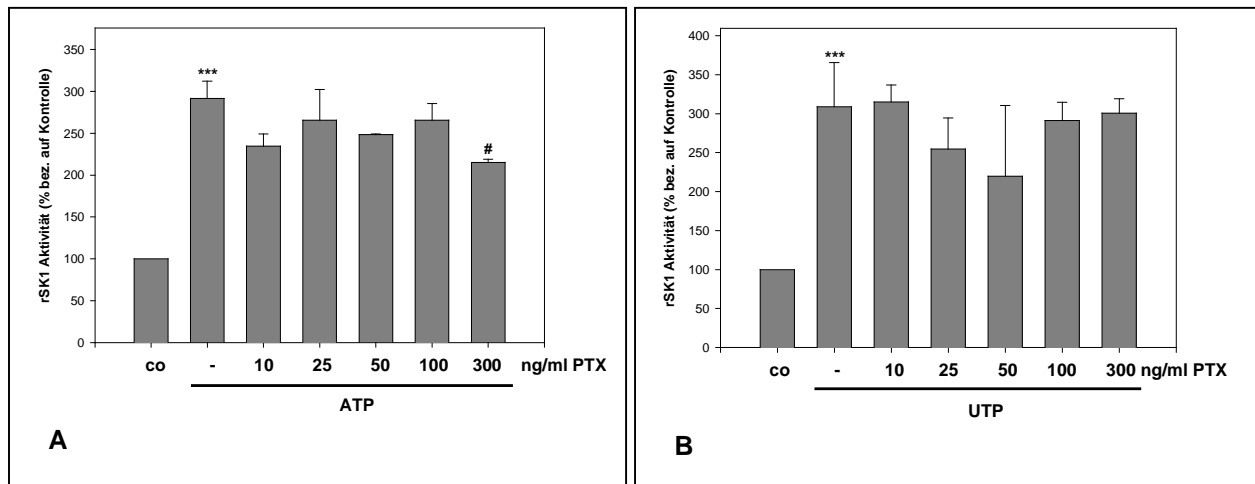


Abb. 16: Effekt von Pertussistoxin auf die rSPHK 1-Aktivität

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Pertussistoxin über Nacht präinkubiert und anschliessend mit 100 μ M ATP (Abb. 16A) oder UTP (Abb. 16B) für weitere 16 Stunden stimuliert. Für die Aktivitätsassays wurden je 50 μ g Protein eingesetzt. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). ***p<0.001 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle, #p<0.05 als statistisch signifikant bezogen auf die ATP-stimulierten Werte angesehen.

Wie die Abbildung 16 zeigt, hat die Gabe von Pertussistoxin lediglich bei einer verwendeten Konzentration von 300 ng/ml Pertussistoxin einen reduzierenden Effekt auf die durch ATP induzierbare Aktivitätserhöhung der rSK 1. Im Falle aller weiteren verwendeten Pertussistoxin-Konzentrationen konnte sowohl bei Stimulation mit ATP als auch mit UTP keine signifikante Verminderung der Aktivität der Sphingosinkinase 1 nachgewiesen werden. Pertussistoxin führt zur ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten von G_i - und G_o - Proteinen. Diese Modifizierung bewirkt eine Blockierung der Alpha-Untereinheit des G-Proteins. Handelt es sich um ein G_i -Protein, wird die Alpha-Untereinheit in einem inaktiven Zustand gehalten und die nachfolgende Inhibierung der Adenylatcyclase unterbleibt. Dadurch wird der cAMP-Spiegel in der Zelle nicht reduziert und dadurch gesteuerte Regulationsmechanismen unterbleiben. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine Signaltransduktion über Purinrezeptoren, die an inhibitorische G-Protein gekoppelt sind, zumindest für die UTP-vermittelte Antwort keine Rolle spielt. Da die Inhibierung der Aktivitätssteigerung durch ATP ebenfalls erst bei einer hohen Konzentration von Pertussistoxin auftritt und verhältnismässig gering ausfällt, muss eine Involvierung von G_i -gekoppelten Purinrezeptoren auch bei der ATP-vermittelten Aktivitätssteigerung erst noch weiter abgeklärt werden. Da frühere Studien unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt haben, dass extrazelluläre Nukleotide in der Lage sind, sowohl die PKC (Huwiler und Pfeilschifter, 1996) als auch die p42/44-MAPK (Huwiler und Pfeilschifter, 1994) und die p38-MAPK (Huwiler et al., 2000) zu aktivieren, wurde die Beteiligung dieser Proteinkinasen an den beobachteten Effekten auf die Aktivität der Sphingosinkinase 1 durch den Einsatz spezifischer Hemmstoffe näher untersucht.

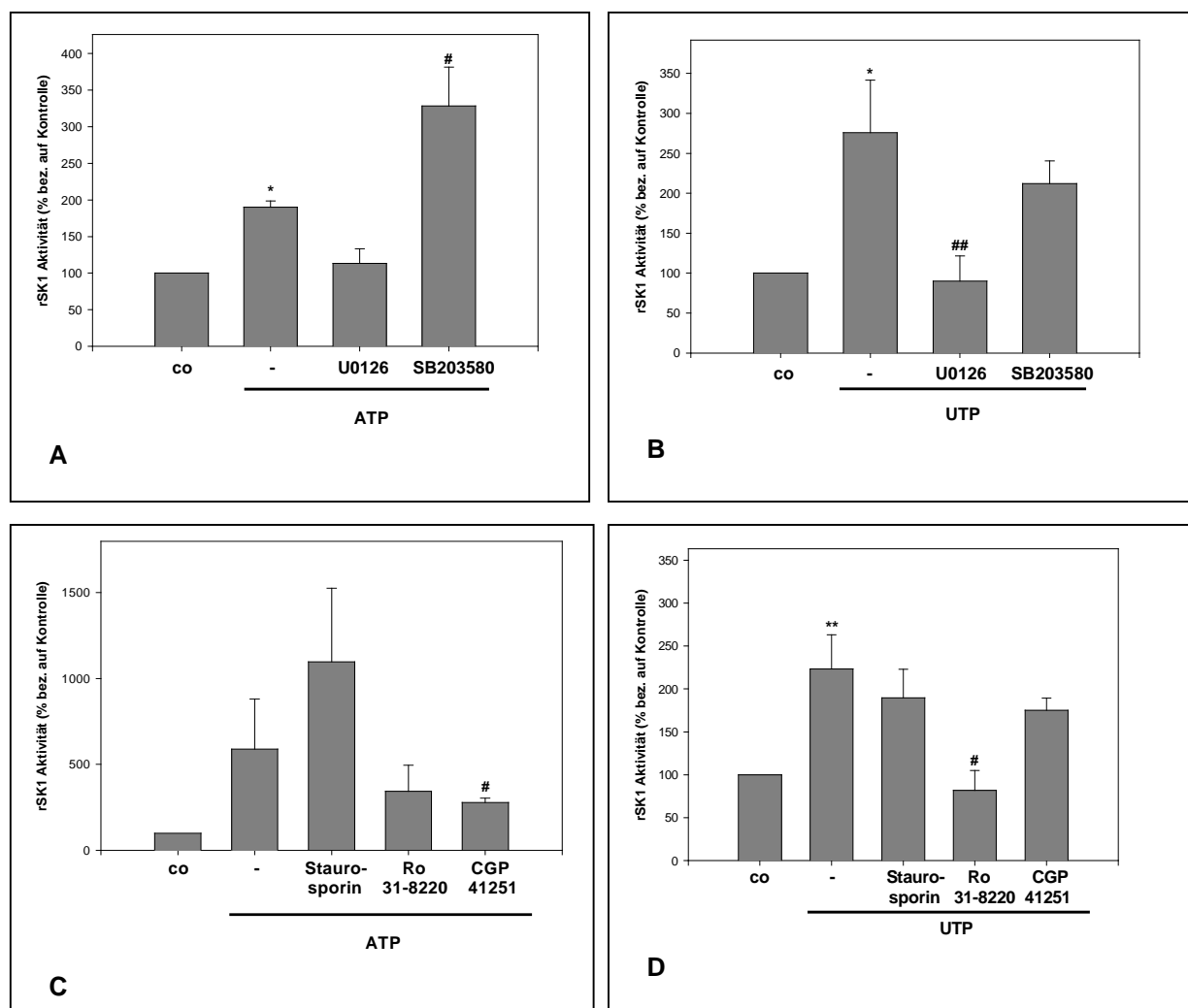


Abb. 17: Effekt von MAPK- und PKC-Inhibitoren auf die rSPHK 1-Aktivität

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit verschiedenen MAPK- (U0126: 20 μ M, SB203580: 10 μ M; Abb. 17A/B) und PKC-Inhibitoren (Staurosporin: 100nM, Ro 31-8220: 10 μ M; CGP 41251: 100 μ M; Abb. 17C/D) 30 Minuten präinkubiert. Danach wurde der entsprechende Stimulus (ATP in Abb. 17A/C, UTP in Abb. 17B/D) zugesetzt und in Anwesenheit der Inhibitoren für weitere 6 Stunden inkubiert. Für die Aktivitätsassays wurden je 50 μ g Protein eingesetzt. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). *p<0.05, **p<0.01 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle, #p<0.05, ##p<0.01 als statistisch signifikant bezogen auf den ATP- bzw. UTP-stimulierten Wert angesehen.

Wie die Abbildung 17 zeigt, kann der MEK-Inhibitor U0126 die durch ATP (Abb. 17A) und UTP (Abb. 17B) induzierte Steigerung der Kinaseaktivität komplett blockieren, während der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 keinen reduzierenden Effekt zeigt, sondern die Aktivität der Kinase eher noch steigert. Um die PKC-Isoformen zu blockieren wurden zwei unterschiedliche Hemmstoffe verwendet, Ro 31-8220 (Davis et al., 1992) und CGP 41251 (Meyer et al., 1989). Ro 31-8220 ist ein Inhibitor aller PKC-Subtypen (mit Ausnahme der PKC ξ), während CGP 41251 eine Selektivität für die Calcium abhängigen PKC-Isoenzyme besitzt. Sowohl Ro 31-8220 als auch CGP 41251 sind bei Stimulation mit ATP wirksam, während bei Stimulation mit UTP nur Ro 31-8220 eine Reduzierung der

Sphingosinkinaseaktivität hervorruft. Aus diesen Versuchen kann daher auf eine Beteiligung von ERK 1 oder 2 und mindestens einem PKC-Subtyp bei der durch ATP und UTP vermittelten Aktivitätssteigerung der rSPHK 1 in den Mesangiumzellen der Ratte geschlossen werden.

3.2 Effekte der extrazellulär applizierten Nukleotide ATP und UTP auf die Expression der Sphingosinkinase 1

3.2.1 Effekt von ATP auf die Expression der Sphingosinkinase 1

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Stimulation von Mesangiumzellen mit ATP über 20 Stunden zu einer massiven Erhöhung der Aktivität der Sphingosinkinase 1 führt, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob diese Veränderung auf eine erhöhte mRNA-Expression zurückgeführt werden kann.

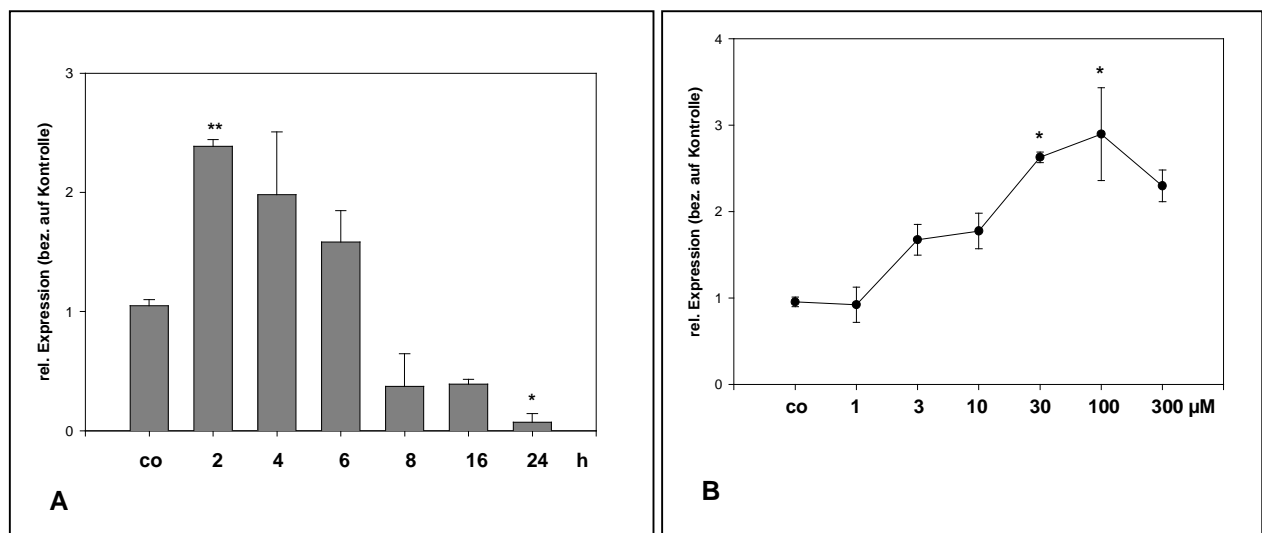


Abb. 18: Induktion der Transkription der *rSPHK 1* durch ATP

Ruhende Mesangiumzellen wurden zum einen mit 100 µM ATP stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (Abb. 18A), oder aber mit den angegebenen ATP-Konzentrationen für sechs Stunden inkubiert (Abb. 18B). Nach der Isolierung der RNA wurde eine quantitative Real Time PCR mit Primern und Sonden für die Sphingosinkinase 1 der Ratte, sowie für die eukaryotische 18 sRNA als Housekeeper durchgeführt. Als Maßstab für die Expression der *rSPHK 1*-mRNA (bezogen auf die Expression der 18sRNA) wurden die $\Delta\Delta C_t$ -Werte verwendet. Die Expressionsdaten sind als x-fache Induktion der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). *p<0.05 und **p<0.01 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

Wie Abbildung 18A zeigt, wird die mRNA-Expression der *rSPHK 1* durch ATP bereits nach zwei Stunden maximal induziert. Diese Hochregulation der mRNA-Expression ist jedoch erwartungsgemäß nur transient, denn bereits nach acht Stunden liegt die Expression unterhalb des Kontrollwerts. Zusätzlich wurde auch die Dosisabhängigkeit näher untersucht.

Ergebnisse

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bereits 3 μM ATP die mRNA-Expression induzieren können, allerdings noch nicht signifikant. Die stärkste Induktion ist mit 100 μM ATP zu beobachten. Eine solche Erhöhung der mRNA-Spiegel ist durch zwei mögliche Mechanismen denkbar. Zum einen kann die vorhandene mRNA durch stabilisierende Proteine vor dem Abbau durch Exonukleasen geschützt werden. Zum anderen kann die Transkription der genspezifischen mRNA durch die extrazellulären Nukleotide induziert werden. Die Möglichkeit der mRNA-Stabilisierung durch ATP wurde nachfolgend durch die Verwendung von Actinomycin D, einem Transkriptionsinhibitor isoliert aus *Streptomyces antibioticus*, untersucht. Das Molekül enthält einen Phenoxazon-Ring, der, besonders in GC-reichen Abschnitten, mit der DNA interkaliert und somit die Transkription (in niedriger Dosierung), aber auch die Replikation (in höherer Dosierung) blockiert (Jones, 1976).

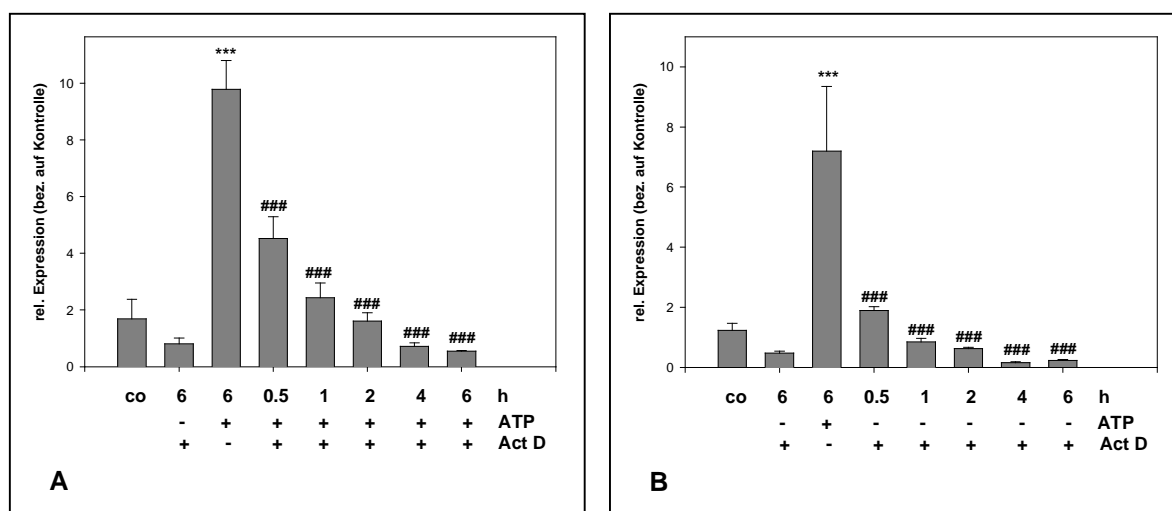


Abb. 19: Untersuchung zur mRNA-Stabilität der rSPHK 1-mRNA

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit Actinomycin D (5 ng/ml) für 30 Minuten präinkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Actinomycin D (5 ng/ml) alleine, mit Actinomycin D (5 ng/ml) und ATP (100 μM) oder nur mit ATP (100 μM) für die angegebenen Zeiträume stimuliert (Abb. 19A). Für Abb. 19B wurden die Zellen mit Actinomycin D (5 ng/ml) für 30 Minuten präinkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen für 30 Minuten mit ATP und Actinomycin D (5 ng/ml) inkubiert und danach mit Actinomycin D (5 ng/ml) für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Als Kontrolle dienten jeweils unstimulierte Zellen (co). Nach Isolierung der RNA wurde eine quantitative Real Time PCR mit Primern und Sonden für die Sphingosinkinase 1 der Ratte, sowie für die eukaryotische 18 sRNA als Housekeeper durchgeführt. Als Maßstab für die Expression der rSPHK 1-mRNA (bezogen auf die Expression der 18sRNA) wurden die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte verwendet. Die Expressionsdaten sind als x-fache Induktion der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). ***p<0.001 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle, ###p<0.001 als statistisch signifikant bezogen auf die ATP-stimulierten Werte angesehen.

Wie Abbildung 19A zeigt, führt die Gabe von Actinomycin D zur Hemmung der *de novo* mRNA-Synthese. Die Inkubation in Abwesenheit des Stimulus führt zu einem zeitabhängigen Abbau der rSPHK 1-mRNA, mit einer errechneten Halbwertszeit von unter 30 Minuten (Abb.

19B). Die Weiterinkubation in Anwesenheit von ATP führt ebenfalls zu einem zeitabhängigen Abbau der *rSPHK 1*-mRNA, mit einer vergleichbaren Halbwertszeit von ca. 20 Minuten (Abb. 19A). Unsere Versuche zeigen, dass die Stimulation mit ATP die Expression der *rSPHK 1* induzieren kann und dieser Prozess durch Inhibierung der Transkription unterbleibt. Bei gleichzeitig fortschreitender mRNA-Degradation über die üblichen Mechanismen (Decapping, Deadenylierung, Abbau über das Exosom) verringert sich entsprechend der Gehalt der genspezifischen mRNA. Durch die bisher durchgeführten Experimente konnte daher gezeigt werden, dass die beobachtete Aktivitätssteigerung der Sphingosinkinase 1 durch ATP über eine vermehrte mRNA-Synthese erklärt werden kann.

3.2.2 Effekt von UTP auf die Expression der Sphingosinkinase 1

Da auch UTP in der Lage war, die Aktivität der Sphingosinkinase 1 zu erhöhen, wurde untersucht, ob UTP ebenfalls die Transkription der *rSPHK 1*-mRNA modulieren kann.

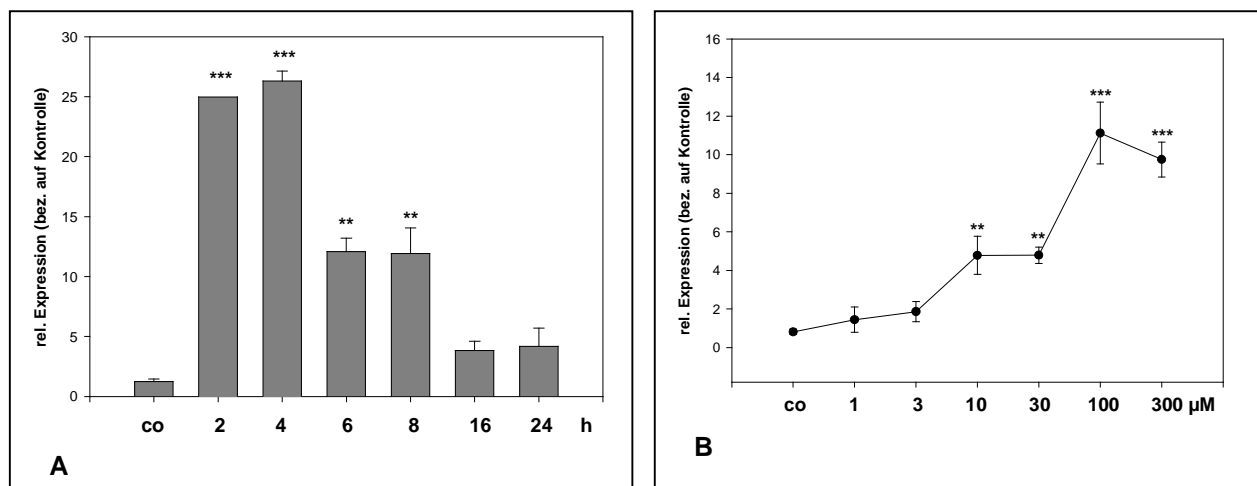


Abb. 20: Induktion der Transkription der *rSPHK 1*-mRNA durch UTP

Ruhende Mesangiumzellen wurden zum einen mit 100µM UTP stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (Abb. 20A), oder aber mit den angegebenen UTP-Konzentrationen für sechs Stunden inkubiert (Abb. 20B). Nach der Isolierung der RNA wurde eine quantitative Real Time PCR mit Primern und Sonden für die Sphingosinkinase 1 der Ratte, sowie für die eukaryotische 18 sRNA als Housekeeper durchgeführt. Als Maßstab für die Expression der *rSPHK 1*-mRNA (bezogen auf die Expression der 18sRNA) wurden die $\Delta\Delta Ct$ -Werte verwendet. Die Expressionsdaten sind als x-fache Induktion der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

Wie die Abbildung 20A zeigt, führt die Inkubation mit UTP bereits nach zwei Stunden zu einer maximal induzierten mRNA-Expression der *rSPHK 1*-mRNA. Diese bleibt ca. vier Stunden maximal und nimmt dann wieder konstant über die nächsten 20 Stunden bis zum Erreichen des Kontrollwertes ab. Bei einer Inkubationszeit von sechs Stunden zeigt sich

Ergebnisse

auch, wie bereits für ATP beschrieben, eine dosisabhängige Steigerung der mRNA-Expression der *rSPHK 1*. Der Effekt ist, ähnlich wie bei der Stimulation mit ATP, maximal bei 100 μM UTP. Interessanterweise ist die Wirkung von UTP auf die mRNA-Expression und die Aktivität der Sphingosinkinase 1 sehr viel stärker als die Wirkung von ATP. Dies passt zu früheren Befunden, die zeigen konnten, dass UTP ein wesentlich potenterer Stimulus für die Freisetzung von IP_3 oder die Aktivierung der MAPK-Kaskaden ist (Huwiler und Pfeilschifter, 1994, 1996, Huwiler et al., 2000). Auch für UTP sollte nun die Möglichkeit einer mRNA-Stabilisierung durch Einsatz von Actinomycin D untersucht werden.

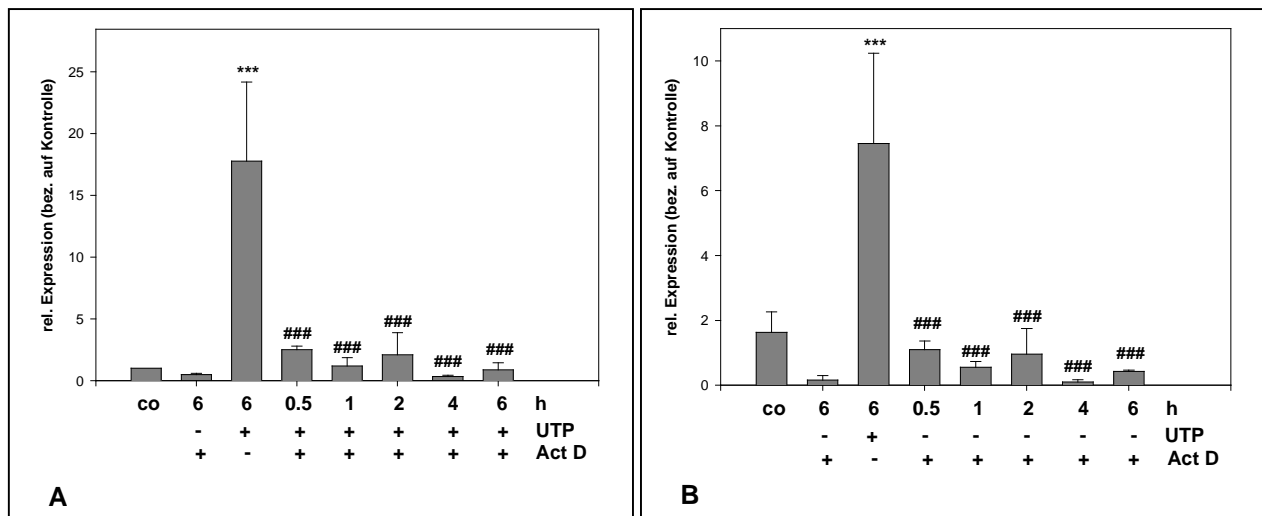


Abb. 21: Untersuchung zur mRNA-Stabilität der *rSPHK 1*-mRNA

Ruhende Mesangiumzellen wurden mit Actinomycin D (5 ng/ml) für 30 Minuten präinkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Actinomycin D (5 ng/ml) alleine, mit Actinomycin D (5 ng/ml) und ATP (100 μM) oder nur mit ATP (100 μM) für die angegebenen Zeiträume stimuliert (Abb. 21A). Für Abb. 21B wurden die Zellen mit Actinomycin D (5 ng/ml) für 30 Minuten präinkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen für 30 Minuten mit ATP und Actinomycin D (5 ng/ml) inkubiert und danach mit Actinomycin D (5 ng/ml) für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Als Kontrolle dienten jeweils unstimulierte Zellen (co). Nach der Isolierung der RNA wurde eine quantitative Real Time PCR mit Primern und Sonden für die Sphingosinkinase 1 der Ratte, sowie für die eukaryotische 18 sRNA als Housekeeper durchgeführt. Als Maßstab für die Expression der *rSK 1*-mRNA (bezogen auf die Expression der 18sRNA) wurden die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte verwendet. Die Expressionsdaten sind als x-fache Induktion der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). ***p<0.001 wurde als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle, ###p<0.001 als statistisch signifikant bezogen auf die UTP-stimulierten Werte angesehen.

Wie Abbildung 21A zeigt, führt die Gabe von Actinomycin D ebenfalls zu einer Hemmung der *de novo* mRNA-Synthese nach Stimulation mit UTP. Die Halbwertszeit der *rSPHK 1*-mRNA wurde in Abwesenheit von UTP (Abb. 21B) auf ca. 20 Minuten berechnet, unter Anwesenheit von UTP (Abb. 21A) auf unter 20 Minuten. Damit stimmen diese Werte mit den für ATP erhaltenen Werten weitgehend überein und legen nahe, dass die gesteigerte Aktivität der

Sphingosinkinase 1 auf eine Aktivierung des Promotors des entsprechenden Gens zurückzuführen ist. Um dies zu verifizieren, wurde eine Analyse des Promotors der *rSPHK 1* durchgeführt. Dazu wurden zwei unterschiedlich große Bereiche 5'-aufwärts des 5'-UTRs des Sphingosinkinase 1-Genes kloniert und auf ihre Aktivierbarkeit hin untersucht.

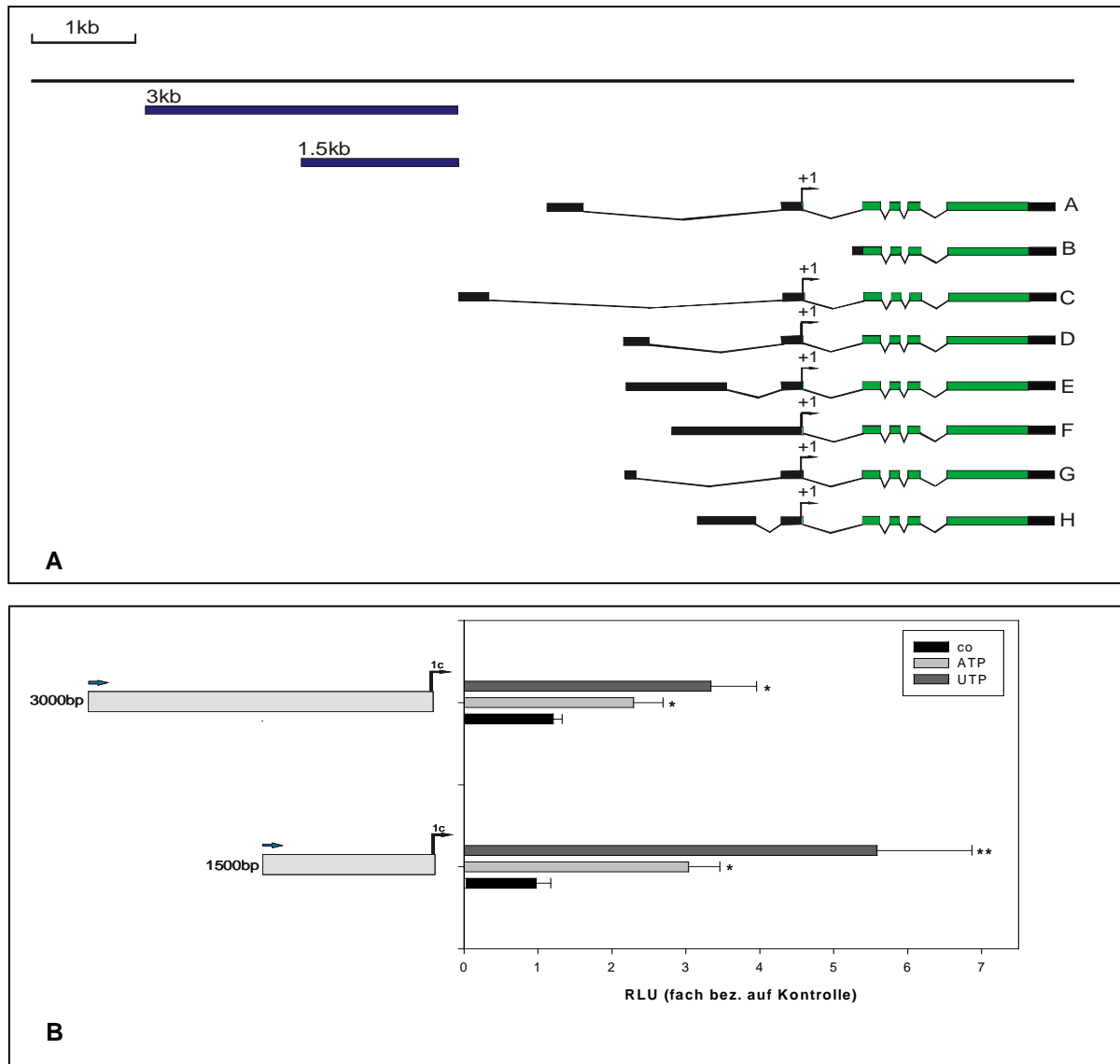


Abb. 22: Gen- und Promotorstruktur der *rSPHK 1*

Abbildung 22A zeigt die Genstruktur der *rSPHK 1* im Überblick. In der Literatur sind acht alternative Transkripte (*rSPHK 1a-h*) beschrieben, die sich jedoch nur in der Nutzung der Exons im 5'-UTR (schwarz) des Gens voneinander unterscheiden. Die proteinkodierenden Exons (grün) sind bei allen bisher beschriebenen alternativen Transkripten identisch. Die beiden für die Versuche verwendeten Promotorbereiche von 1,5 kb bzw. 3 kb sind ebenfalls hervorgehoben. Abb. 22B zeigt das Ergebnis der Promotorstudien. Dazu wurden Mesangiumzellen der Ratte mit den entsprechenden Promotorfragmenten über Nacht transfiziert. Die ruhenden Zellen wurden anschließend für 16 Stunden mit ATP oder UTP (jeweils 100 μ M) stimuliert, nach Herstellerangaben lysiert und dem Promotorassay unterzogen. Die Aktivitätsdaten sind als x-fache Induktion der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=8). *p<0.05 und **p<0.01 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte angesehen.

Wie Abbildung 22B deutlich zeigt, kann in den Mesangiumzellen sowohl das 1,5 kb große als auch das 3 kb große Promotorfragment durch ATP und UTP aktiviert werden, wobei jedoch das kürzere Fragment stärker aktiviert wird. Dieser Effekt könnte jedoch auch auf eine geringere Transfektionseffizienz des größeren Promotorfragments zurückzuführen sein. In beiden Fällen zeigt sich jedoch die stärkere Aktivierbarkeit des Promotors durch UTP.

3.3 Beteiligung der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase an Zellantworten von Mesangiumzellen

Da die Sphingosinkinase 1 durch ATP und UTP in ihrer Aktivität biphasisch reguliert werden kann, bleibt es nun noch zu zeigen, ob diese Aktivierung eine funktionelle Bedeutung in Mesangiumzellen hat. Zellantworten, die in der Literatur durch Nukleotide oder Sphingosin-1-Phosphat beeinflusst werden umfassen unter anderem die Migration (Rossi et al., 2007; Agresti et al., 2005) und die Proliferation (Schulze-Lohoff et al., 1992, Huwiler und Pfeilschiffer, 1994, Milosevic et al., 2006, Lockmann et al., 2004; Kohno et al., 2006; Kim et al., 2006). Dies deutet auf eine mögliche Funktion der Sphingosinkinase 1 oder 2 in beiden Zellantworten hin. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen die Migrations- und Proliferationsfähigkeit der Mesangiumzellen in Abhängigkeit von der Aktivität der Sphingosinkinasen 1 und 2 näher untersucht.

3.3.1 Rolle von Nukleotiden, Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei der Migration von Mesangiumzellen

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele dafür, dass ATP und UTP die Migration verschiedenster Zelllinien induzieren können. So konnten pro-migratorische Effekte in Mastzellen (McCloskey et al., 1999), glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta (Chaulet et al., 2001; Pillois et al., 2002), Microgliazellen (Honda et al., 2001), Oligodendrocyten (Agresti et al., 2005) Monocyten (Kaufmann et al., 2005), HUVEC (human umbilical vein cell; Kaczmarek et al., 2005) und hämatopoetischen Stammzellen (Rossi et al., 2006) gezeigt werden. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob Mesangiumzellen durch extrazelluläre Nukleotide zur Migration angeregt werden können und ob dieser Effekt in Zusammenhang mit der Aktivierung der Sphingosinkinasen steht.

Ergebnisse

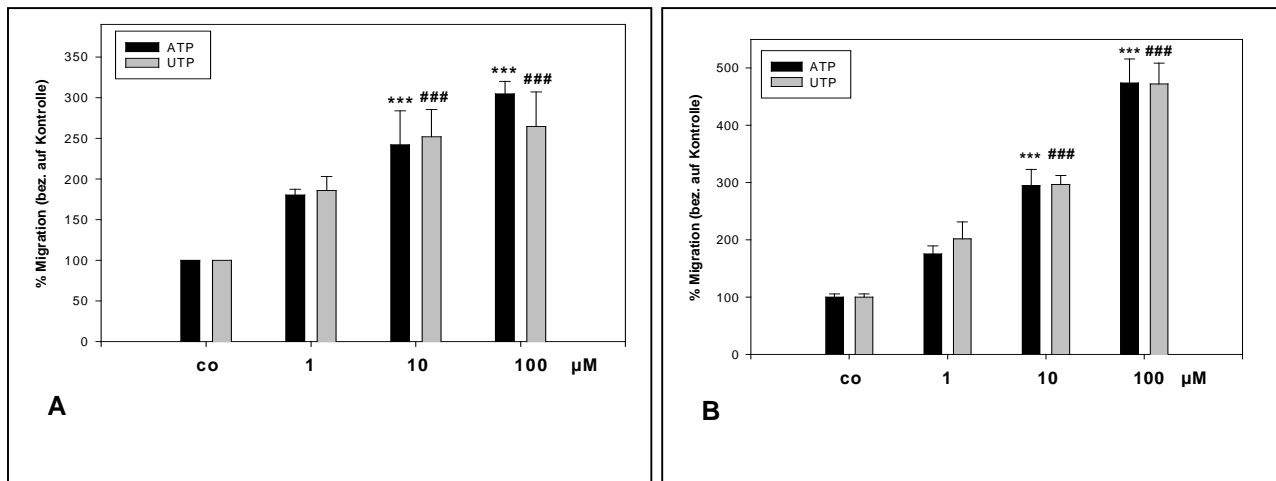


Abb. 23: Effekt von ATP und UTP auf die Migration von Mesangiumzellen

Für die Migrationsassays wurden ruhende Mesangiumzellen der Ratte (Abb. 23A) oder des Menschen (Abb. 23B) trypsinisiert, gezählt und 10^5 Zellen/100 µl je Transwell-Insert ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden entweder mit DMEM (co), ATP (1-100 µM) oder UTP (1-100 µM) inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und gezählt. Die Daten sind als % Migration bezogen auf die unstimulierte Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). ***p<0.001 bzw. ###p<0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die jeweiligen Kontrollwerte angesehen.

Wie die Abbildung 23 zeigt, kann die Applikation von ATP oder UTP die Migrationsfähigkeit der verschiedenen hier untersuchten Mesangiumzellen signifikant erhöhen. Dabei scheint die Wirkung auf die humanen Mesangiumzellen (Abb. 23B) stärker auszufallen als auf die Mesangiumzellen der Ratte (Abb. 23A). In beiden untersuchten Spezies konnte gezeigt werden, dass bereits mit 1 µM ATP oder UTP die Migration der Zellen induziert werden kann, allerdings noch nicht signifikant. Erst bei einer zehnfach höheren Konzentration beider Nukleotide, die auch physiologisch durchaus erreicht werden kann, zeigt sich eine signifikante Induktion der Migration in den humanen Mesangiumzellen (Abb. 23B) und denen der Ratte (Abb. 23A). Vergleicht man beide Nukleotide hinsichtlich ihrer Potenz, die Migration in den beiden untersuchten Zelltypen zu induzieren, so kann man erkennen, dass sie in etwa äquipotent sind. Die Ergebnisse dieser Versuche stehen damit in Übereinstimmung mit zahlreichen Publikationen, die die migrationsinduzierende Wirkung von extrazellulären Nukleotiden bereits in zahlreichen anderen Zellsystemen zeigen konnten. In einem weiteren Schritt sollte nun die Kinetik der Migration, die durch ATP und UTP induzierbar ist, näher untersucht werden. Darüber hinaus sollte abgeklärt werden, ob ATP und UTP auch chemotaktisch aktiv sind, d.h. die Mesangiumzellen zu einer Migration in Richtung ATP oder UTP veranlassen können.

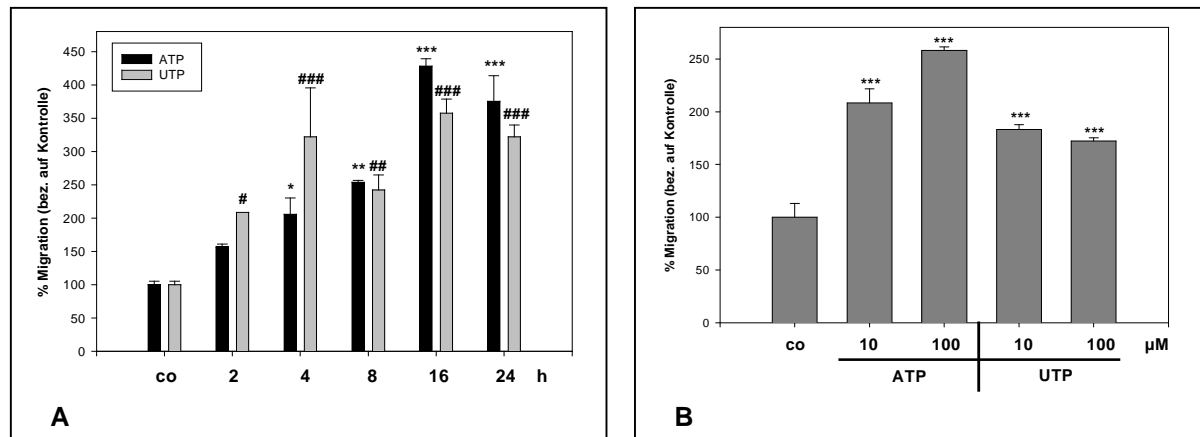


Abb. 24: Zeitkinetik der Migration und Untersuchung der Chemotaxis von Mesangiumzellen

Für die Migrationsassays wurden ruhende Mesangiumzellen der Ratte (Abb. 24A) trypsinisiert, gezählt und 10^5 Zellen/100 μ l je Transwell-Insert ausgesät. Die Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer entweder mit DMEM (co), ATP (100 μ M) oder UTP (100 μ M) inkubiert. Für Abbildung 24B wurden ruhende Mesangiumzellen ebenfalls trypsinisiert, gezählt und 10^5 Zellen/100 μ l je Transwell-Insert ausgesät. Der entsprechende Stimulus (DMEM (co), ATP (100 μ M) oder UTP (100 μ M)) wurde in die untere Kammer appliziert und 24 Stunden inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und gezählt. Die Daten sind als % Migration bezogen auf die unstimulierte Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 bzw. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die jeweiligen Kontrollwerte angesehen.

Wie zu vermuten war, folgt die Migration der Mesangiumzellen einer Zeitkinetik (Abb. 24A). Bereits nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden beginnen die ersten Zellen unter dem Einfluss der extrazellulären Nukleotide zu migrieren. Dabei erscheint UTP in der Anfangszeit als der etwas potentere Stimulus. Die Zahl der migrierenden Zellen nimmt mit zunehmender Versuchsdauer weiter zu und erreicht einen maximalen Wert nach 16 bis 24 Stunden. Auch eine chemotaktische Migration der Rattenmesangiumzellen kann nach Applikation von ATP und UTP nachgewiesen werden (Abb. 24B). Diese Migration scheint zumindest bei Stimulation mit ATP von der verwendeten Dosis abzuhängen. In einem weiteren Schritt sollte nun geklärt werden, ob die Sphingosinkinasen eine Rolle bei der durch die extrazellulären Nukleotide induzierten Migration spielen. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze genutzt; einerseits wurden die Sphingosinkinase 1 und 2 der Ratte durch spezifische siRNA depletiert, andererseits wurden Mesangiumzellen verwendet, die entweder aus dem Wildtyp, hSPHK1-überexprimierenden oder mSPHK 1-defizienten Mäusen isoliert worden waren. Nach Verwendung der entsprechenden siRNAs zur Depletion der Sphingosinkinase 1 oder 2 konnte in den Mesangiumzellen der Ratte eine Reduktion der Sphingosinkinase 1 um ca. 70 % festgestellt werden (Abb. 25A). Für die Sphingosinkinase 2 konnte ebenfalls eine Depletion von ca. 60 % erzielt werden (Abb. 25B).

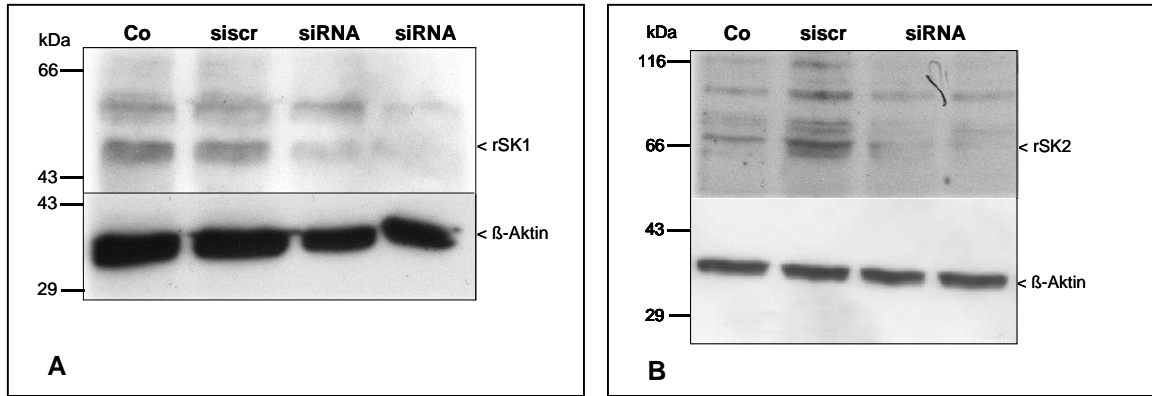


Abb. 25: Nachweis der Funktionalität einiger der verwendeten siRNAs

Zur Überprüfung der Funktionalität der verwendeten siRNAs wurden die Zellen nach Herstellerangaben mit den entsprechenden siRNAs transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die SDS-Gele wurden je 70 µg Gesamtprotein verwendet. Abbildung 25A zeigt die Wirkung der rSPHK1 (=rSK 1) siRNA, Abbildung 25B die der rSPHK2 (=rSK 2) siRNA.

Nachdem die Funktionalität der verwendeten siRNAs nachgewiesen worden war, wurde die Wirkung der Depletion der Sphingosinkinasen auf die durch extrazelluläre Nukleotide induzierbare Migrationsfähigkeit der humanen und der Rattenmesangiumzellen untersucht.

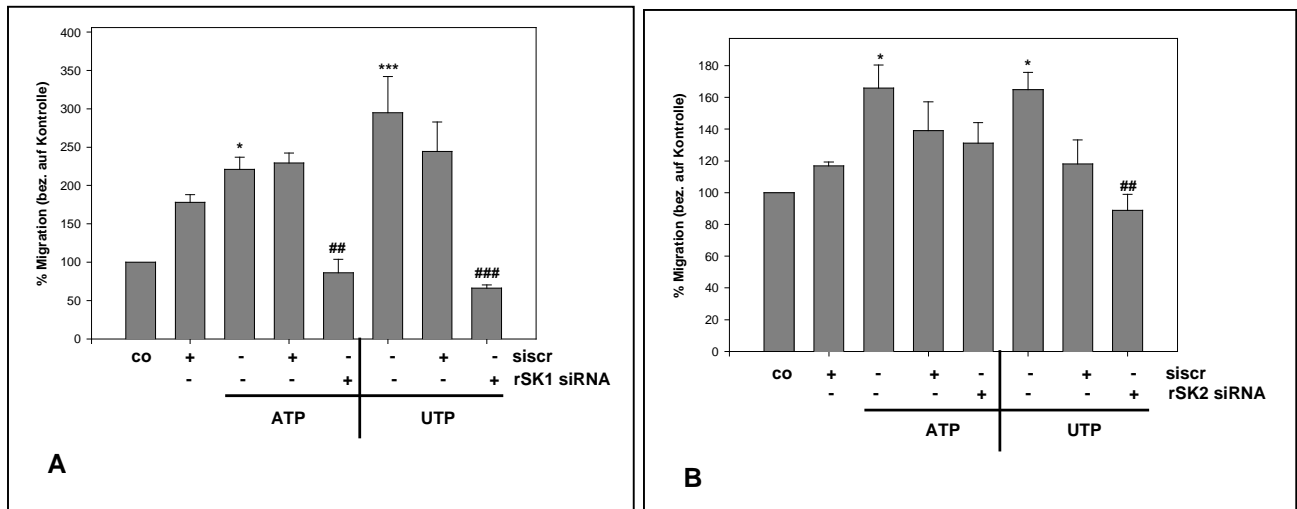


Abb. 26: Einfluss der Depletion der Sphingosinkinase 1 oder 2 auf die durch extrazelluläre Nukleotide induzierte Migration von Mesangiumzellen

48 Stunden nach der Transfektion wurden die gehungerten Zellen trypsinisiert, gezählt und pro Transwell-Insert 10^5 Zellen/100 µl in Anwesenheit von ATP (100 µM), UTP (100 µM) oder DMEM (co) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und gezählt. Die Abbildungen 26A und 26B zeigen die Ergebnisse nach Depletion der Sphingosinkinase 1 bzw. 2 in den Rattenmesangiumzellen. Die Daten sind als % Migration bezogen auf die unstimulierte Kontrolle bzw. die scrambled siRNA angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=3). *p<0.05 und ***p<0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte, ###p<0.001 als signifikant bezogen auf den jeweiligen Stimulus angesehen.

Die Versuche zeigen, dass die Depletion der Sphingosinkinase 1 in den Rattenmesangiumzellen die durch ATP und UTP induzierbare Migration der Zellen blockieren kann. Dies lässt auf eine funktionelle Rolle dieses Enzyms bei der Regulation der Migration in diesem Zelltyp schließen. Im Gegensatz dazu scheint die Depletion der Sphingosinkinase 2 nur bei Stimulation mit UTP einen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen auszuüben. Warum eine Reduktion der Migrationsfähigkeit nicht auch unter Stimulation mit ATP auftritt, muss in weitergehenden Versuchen nochmals abgeklärt werden.

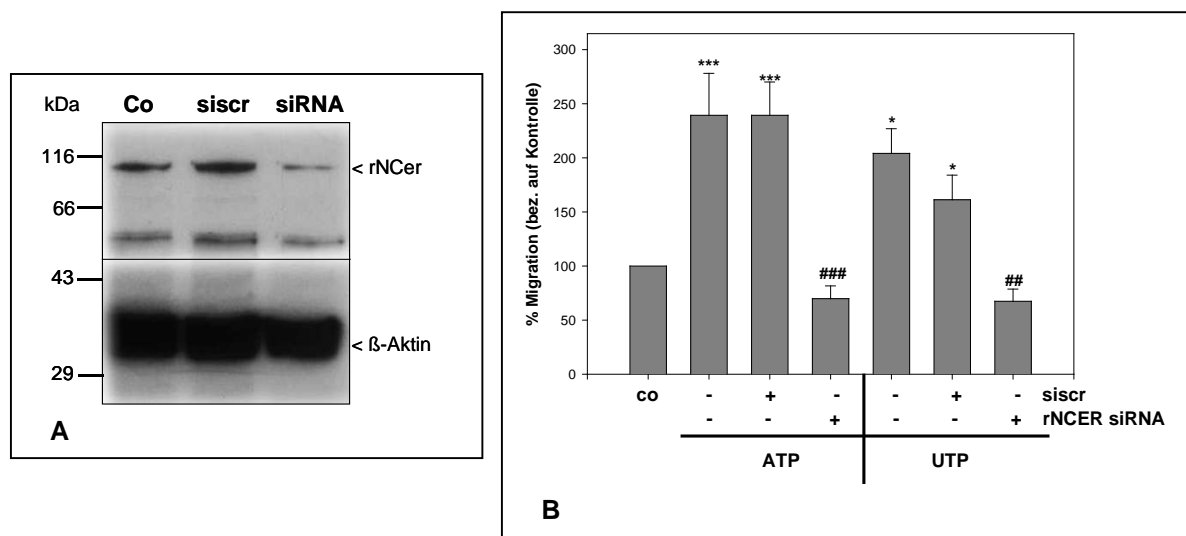


Abb. 27: Nachweis der Depletion der neutralen Ceramidase, sowie Einfluss der Depletion auf die durch extrazelluläre Nukleotide induzierte Migration von Mesangiumzellen

Zur Überprüfung der Funktionalität der siRNA wurden die Zellen nach Herstellerangaben transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für das SDS-Gel wurden je 70 μ g Gesamtprotein verwendet. Abbildung 27A zeigt die Wirkung der rNSCER siRNA. Für die Migration wurden die gehungerten Zellen 48 Stunden nach der Transfektion tryptinisiert, gezählt und pro Transwell-Insert 10^5 Zellen/100 μ l in Anwesenheit von ATP (100 μ M), UTP (100 μ M) oder DMEM (co) ausgesät (Abb. 27B). Nach 24 Stunden wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und gezählt. Die Daten sind als % Migration bezogen auf die unstimulierte Kontrolle bzw. die scrambled siRNA angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). *p<0.05 und ***p<0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrollwerte, ###p<0.001 und ####p<0.001 als signifikant bezogen auf die ATP- bzw. UTP-stimulierten Werte angesehen.

Abbildung 27 zeigt die Wirkung der Depletion der neutralen Ceramidase auf die Migrationsfähigkeit der Mesangiumzellen. Auch die Depletion dieses Enzyms führt zu einer drastisch reduzierten Migration der Zellen. Da es sich bei der neutralen Ceramidase um das den Sphingosinkinasen „vorgeschaltete“ Enzym handelt, das Sphingosin produziert, ergänzt dieser Versuch unsere bisherigen Ergebnisse, da durch das Fehlen von Sphingosin der Sphingosinkinase 1 das Substrat zur Phosphorylierung fehlt und entsprechend die Migration der Mesangiumzellen blockiert wird.

Um auszuschließen, dass es sich bei den mit der siRNA erhaltenen Ergebnissen um „off-target“-Effekte handelt, wurden Migrationsexperimente auch in den Mesangiumzellen der verschiedenen z.T. transgenen Mauslinien (wt, hSPHK1-überexprimierend, mSPHK 1^{-/-}) durchgeführt. Dazu wurde zunächst untersucht, ob in den transgenen Mäusen die Depletion der Sphingosinkinase 1 tatsächlich vorhanden ist.

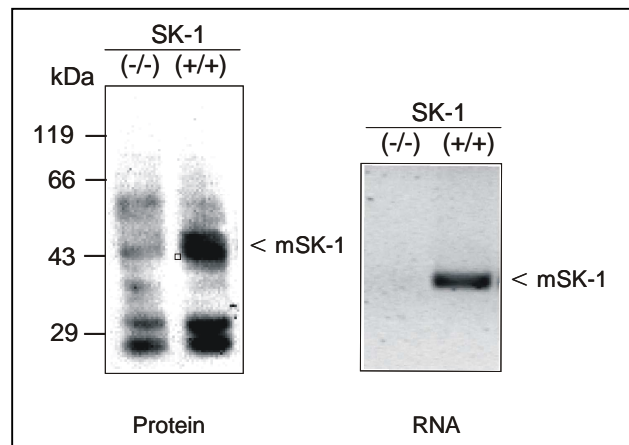


Abb. 28: Nachweis der Depletin der mSPHK 1 in Mausmesangiumzellen

Abbildung 28 zeigt auf Protein- und mRNA-Ebene die Depletion der mSPHK 1 (=mSK-1) in der knock out-Mauszelllinie. Dazu wurden je 100 µg Gesamtprotein einer Probe Wildtyp-Zellen bzw. einer Probe (mSK 1^{-/-})-Zellen einer Westernblot-Analyse unterzogen und mit einem mSPHK 1-spezifischen Antikörper detektiert. Für die PCR-Analyse wurden 2 µg RNA beider Zelllinien in cDNA umgeschrieben und anschliessend eine PCR mit mSK 1-spezifischen Primern durchgeführt.

Nachdem sowohl auf RNA-Ebene mit Hilfe von genspezifischen Primern, als auch auf Proteinebene unter Verwendung des entsprechenden mSPHK 1-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden konnte, dass die Sphingosinkinase 1 in den untersuchten Mausmesangiumzellen tatsächlich depletiert worden ist, wurden die bereits erwähnten Migrationsexperimente mit den so charakterisierten Zellen durchgeführt.

Die auf der nächsten Seite abgebildeten Ergebnisse weiterer Migrationsexperimente zeigen, dass die extrazellulären Nukleotide ATP und UTP in der Lage sind, die Migration in den wildtypischen Zellen und den hSK 1-überexprimierenden Zelllinien signifikant zu erhöhen. Dabei ist eindeutig zu erkennen, dass die Migrationsrate bei Applikation beider Nukleotide in den hSPHK 1-überexprimierenden Zellen immer deutlich höher als in den in gleicher Weise stimulierten Wildtyp-Zellen liegt. Dies liefert einen weiteren Hinweis auf die Wichtigkeit der Aktivität der Sphingosinkinase 1 für die Migration in den untersuchten Mausmesangiumzellen.

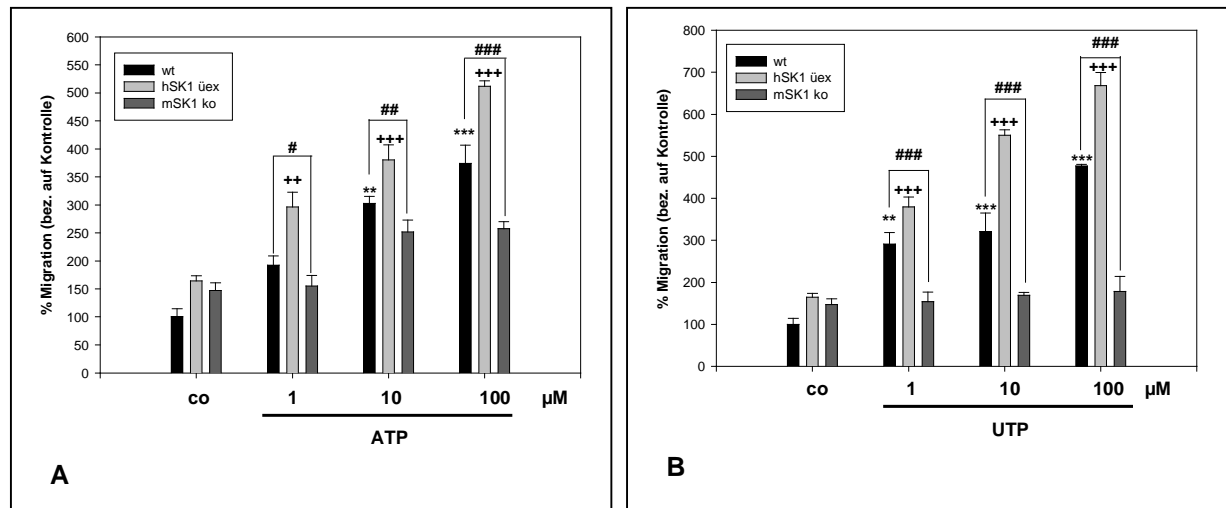


Abb. 29: Effekt von ATP und UTP auf die Migration verschiedener Mausmesangiumzelllinien

Für die Migrationsassays wurden ruhende Mesangiumzellen der drei unterschiedlichen Mauslinien (wt, mSPHK 1^{-/-}, hSPHK 1 überexprimierend) verwendet. Die Zellen wurden trypsiniert, gezählt und 10⁵ Zellen/100 μl je Transwell-Insert ausgesät. Anschliessend wurden die Zellen 24 Stunden entweder mit DMEM (co), ATP (1-100 μM; Abb. 29A) oder UTP (1-100 μM; Abb. 29B) inkubiert. Die Daten sind als % Migration bezogen auf die unstimulierte Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 wurden für die Wildtyp-Zellen als statistisch signifikant bezogen auf die unstimulierten Kontrollwerte angesehen. ++p<0.01, +++p<0.001 wurden für die hSK 1-überexprimierenden Zellen als statistisch signifikant bezogen auf die unstimulierten Kontrollwerte angesehen. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die entsprechenden Wildtyp-Werte angesehen.

Im Gegensatz dazu läßt sich in den mSPHK 1-defizienten Mausmesangiumzellen mit keinem der beiden verwendeten Nukleotide eine signifikante Steigerung der Migrationsrate beobachten. Im Vergleich zwischen den mSPHK 1-defizienten Zellen und den Wildtyp-Zellen zeigt sich eine signifikante Blockade der Migration nach Stimulation mit den extrazellulären Nukleotiden. Dies wiederum zeigt, dass für die Migration in den Mesangiumzellen die Sphingosinkinase 1 von entscheidender Bedeutung ist und bei Fehlen dieses Enzyms die Migration drastisch reduziert ist, während eine Überexpression noch zu einer gesteigerten Migrationsfähigkeit der Zellen führt. Damit konnte auch gezeigt werden, dass es sich bei den mit siRNA beobachteten Effekten um spezifisch auf die Depletion der Sphingosinkinase 1 zurückzuführende Wirkungen gehandelt hat.

In einer nächsten Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob die Erhöhung der Migrationsfähigkeit der Zellen nach Aktivierung der Sphingosinkinase 1 auf die Bildung des Botenstoffes Sphingosin-1-Phosphat durch dieses Enzym zurückzuführen ist. Dazu wurden die humanen, die verschiedenen murinen und die Mesangiumzellen der Ratte mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sphingosin-1-Phosphat stimuliert.

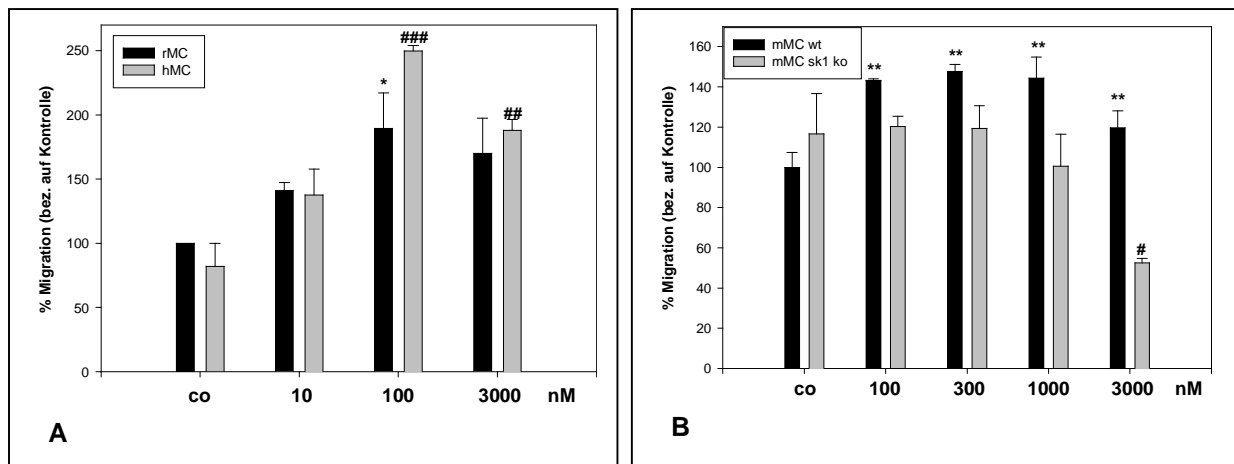


Abb. 30: Einfluss von S1P auf die Migration von Mesangiumzellen

Für die Migrationsassays wurden ruhende Mesangiumzellen der Ratte (Abb. 30A), des Menschen (Abb. 30A) oder der Maus (wt, mSPHK 1^{-/-}, Abb. 30B) trypsiniert, gezählt und 10⁵ Zellen/100 µl je Transwell-Insert ausgesät. Die Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit DMEM (co) oder den angegebenen Konzentrationen von Sphingosin-1-Phosphat inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und gezählt. Die Daten sind als % Migration bezogen auf die unstimulierte Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=3). *p<0.05 und **p<0.01, bzw. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die jeweiligen Kontrollwerte angesehen.

Abbildung 30 zeigt, dass in allen untersuchten Mesangiumzelllinien die Gabe von Sphingosin-1-Phosphat die Migration der Zellen in einer dosisabhängigen Form induzieren kann. Dies trifft jedoch nicht auf die mSPHK 1-defiziente Zelllinie zu. Möglicherweise ist die durch die Sphingosinkinase 1 regulierte Migration in den mSPHK 1-defizienten Zellen in grundlegender Art und Weise gestört, so dass diese Zellen nicht mehr auf die externe Gabe von Sphingosin-1-Phosphat reagieren.

Zuletzt sollte noch untersucht werden, ob die Verwendung der bereits bekannten PKC- und MAPK-Inhibitoren, sowie die Verwendung von Cycloheximid durch Blockierung der Aktivierung des Promotors oder durch Blockade der Translation der Sphingosinkinase 1 Einfluss nehmen kann auf die durch extrazelluläre Nukleotide induzierbaren Migration und damit die bisherigen Daten bestätigen kann.

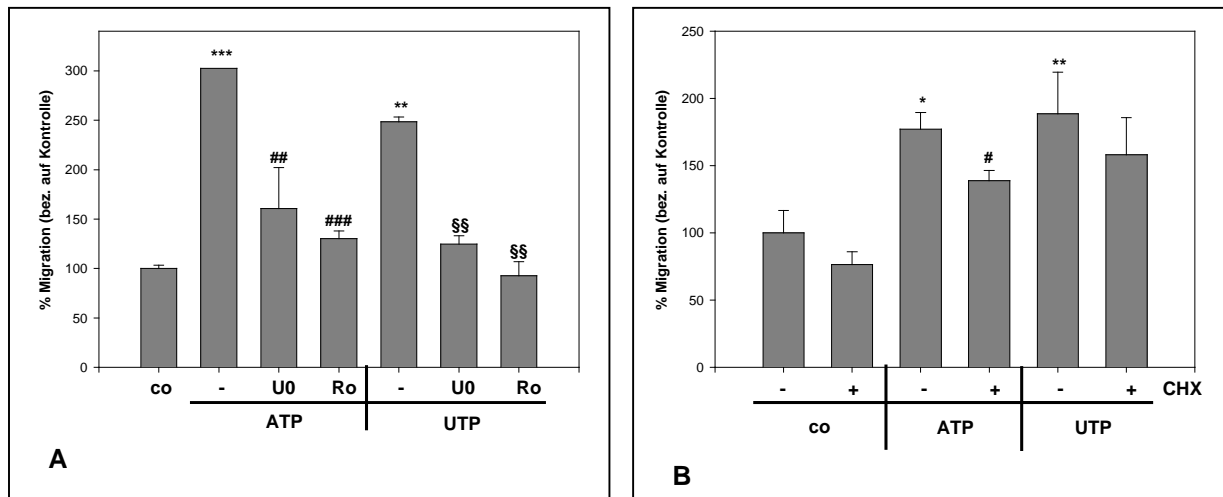


Abb. 31: Einfluss von MAPK- und PKC-Inhibitoren sowie Cycloheximid auf die durch ATP und UTP induzierte Migration von Mesangiumzellen

Für die Migrationsassays wurden ruhende Mesangiumzellen der Ratte (Abb. 31A/B) zunächst 30 Minuten mit Ro 31-8220 (10 μ M), U0126 (20 μ M) (Abb. 31A) oder Cycloheximid (100 ng/ml) (Abb. 31B) präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt und 10^5 Zellen/100 μ l je Transwell-Insert in Anwesenheit der Inhibitoren sowie von ATP (100 μ M), UTP (100 μ M) oder DMEM (co) ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und gezählt. Die Daten sind als % Migration bezogen auf die unstimulierte Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). Als statistisch signifikant angesehen wurden *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 bezogen auf unstimulierte Kontrolle, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 bezogen auf die Stimulation mit ATP und \$\$p<0.01 bezogen auf die Stimulation mit UTP.

Wie die Abbildung 31A zeigt, kann durch die Verwendung sowohl eines PKC- (Ro 31-8220) als auch eines MAPK-Inhibitors (U0126) die durch extrazelluläre Nukleotide induzierbare Migration der Mesangiumzellen blockiert werden. Da mit diesen Inhibitoren auch die Proteinsynthese und die Aktivität der Sphingosinkinase 1 blockiert werden kann, ist es naheliegend zu vermuten, dass die hemmende Wirkung der Kinaseinhibitoren auf die Migration indirekt auf die Blockade der Sphingosinkinase 1 zurückzuführen ist. Auch Cycloheximid kann die durch ATP und UTP induzierbare Migration zumindest partiell reduzieren (Abb. 31B). Dabei ist die inhibierende Wirkung auf die ATP-vermittelte Migration jedoch deutlicher, da statistisch signifikant.

3.4.2 Rolle von Nukleotiden, Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei der Proliferation von Mesangiumzellen

Eine weitere Zellantwort, von der bekannt ist, dass sie durch extrazelluläre Nukleotide induziert werden kann, ist die Proliferation. So konnten proliferative Wirkungen durch Nukleotide beispielsweise in Mesangiumzellen (Schulze-Lohoff et al., 1992, Huwiler und Pfeilschifter, 1994), in humanen Keratinozyten (Lee et al., 2001), in Zellen der Retina (Sanches et al., 2002), glatten Muskelzellen der Atemwege (Michoud et al., 2002), in verschiedenen Lungenkrebszelllinien (Schäfer et al., 2003) und in humanen neuronalen Stammzellen (Milosevic et al., 2006) nachgewiesen werden. Daher wurde untersucht, ob auch dieser durch Nukleotide vermittelten Zellantwort eine Beteiligung der Sphingosinkinase 1 zugrunde liegt. Auch hierfür wurden Depletionsversuche mit den bereits beschriebenen siRNAs (Abb. 25/27) in den Mesangiumzellen durchgeführt.

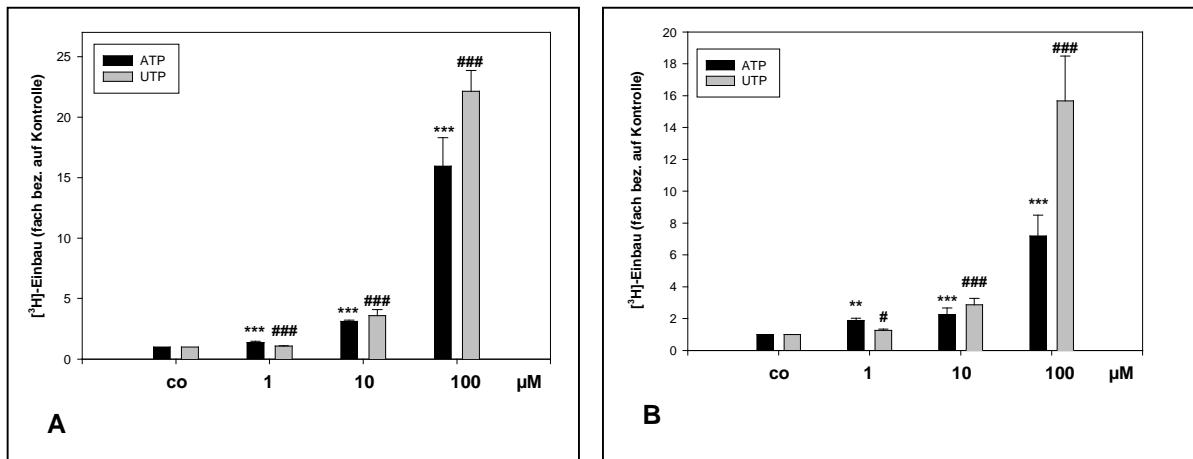


Abb. 32: Wirkung von ATP und UTP auf die Proliferation von Mesangiumzellen

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte (Abb. 32A) oder des Menschen (Abb. 32B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen von ATP oder UTP für 24 Stunden in Anwesenheit von [³H]-Thymidin inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und die Inkorporation des [³H]-Thymidin mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=6). **p<0.01, ***p<0.001, bzw. ###p<0.001 wurden als statistisch signifikant bezogen auf die jeweiligen Kontrollwerte angesehen.

Abbildung 32 zeigt, dass sowohl ATP als auch UTP in Abhängigkeit von der Dosis in der Lage sind die Proliferation der Mesangiumzellen zu induzieren. Die Depletion der Sphingosinkinase 1 durch entsprechende siRNA hat, wie die nachfolgende Abbildung 33 zeigt, keinen Einfluß auf die Proliferationsrate der Zellen. Im Gegensatz dazu führt die Depletion der Sphingosinkinase 2 durch die genspezifische siRNA zumindest bei Stimulation mit UTP zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferationsrate der Mesangiumzellen. Möglicherweise handelt es sich bei der Sphingosinkinase 2 in diesem Falle um einen

negativen Regulator der Proliferation, welches jedoch in weiteren Experimenten noch bestätigt werden muss.

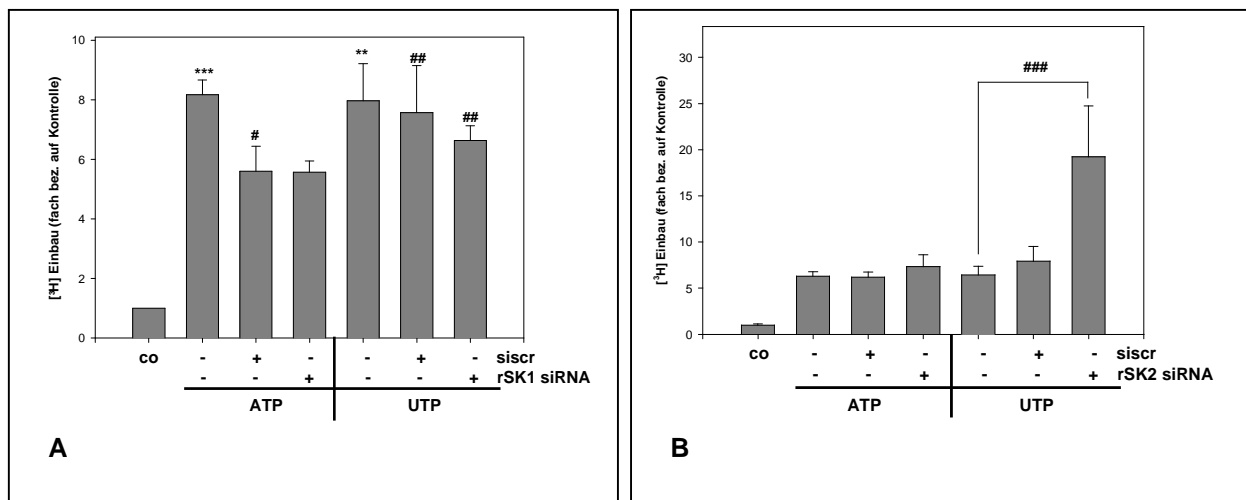


Abb. 33: Wirkung der Depletion der Sphingosinkinasen 1 und 2 durch siRNA auf die durch ATP und UTP induzierte Proliferation von Mesangiumzellen

48 Stunden nach Transfektion wurden die Rattenmesangiumzellen weitere 24 Stunden gehungert und dann für die Proliferation mit ATP (100 μ M), UTP (100 μ M) oder DMEM (co) für 24 Stunden in Anwesenheit von [³H]-Thymidin inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und die Inkorporation des [³H]-Thymidin mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt. Abb. 33A zeigt die Proliferation nach Transfektion mit rSPHK 1 (=rSK 1) siRNA, Abb. 33B nach Transfektion mit rSPHK 2 (=rSK 2) siRNA. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). **p<0.01, ***p<0.001 wurden bezogen auf unstimulierte Kontrolle, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 bezogen auf die jeweilige Stimulation als statistisch signifikant angesehen.

Wie die Abbildung 34 auf der nachfolgenden Seite zeigt, führt die Depletion der neutralen Ceramidase in den Mesangiumzellen der Ratte nur nach Stimulation mit UTP zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate. Die Wirkung der Depletion der neutralen Ceramidase auf die durch ATP stimulierte Proliferation wurde als nicht statistisch signifikant ermittelt, wobei für eine eindeutigere statistische Auswertung zusätzliche Versuchspunkte notwendig erscheinen. Die erhaltenen Daten deuten jedoch darauf hin, dass durch die Depletion der neutralen Ceramidase innerhalb der Zellen Ceramid akkumuliert und dadurch die Proliferation der Zellen deutlich reduziert wird.

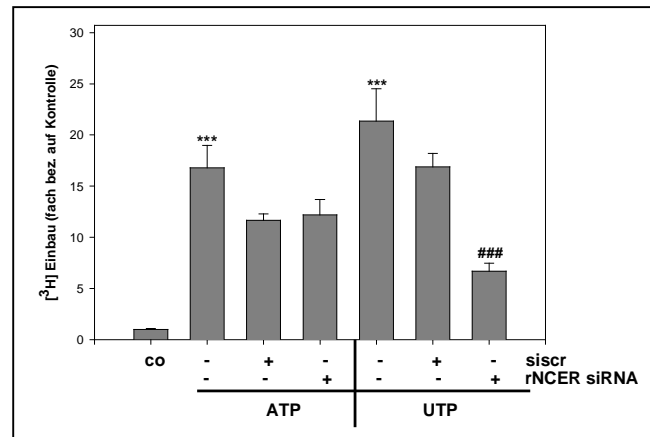


Abb. 34: Wirkung der Depletion der neutralen Ceramidase (=rNCR) durch siRNA auf die durch ATP und UTP induzierte Proliferation von Mesangiumzellen

48 Stunden nach Transfektion wurden die Rattenmesangiumzellen weitere 24 Stunden gehungert und dann für die Proliferation mit ATP (100 µM), UTP (100 µM) oder DMEM (co) für 24 Stunden in Anwesenheit von [³H]-Thymidin inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und die Inkorporation des [³H]-Thymidin mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=3). ***p<0.001 wurde bezogen auf die unstimulierte Kontrolle, ###p<0.001 bezogen auf die jeweilige Stimulation als statistisch signifikant angesehen.

Zur Abklärung der Frage, ob die Aktivität der Sphingosinkinase 1 eine Rolle bei der Kontrolle der Proliferation in den Mesangiumzellen der Ratte innehat, wurde in einer letzten Versuchsreihe untersucht, ob exogen appliziertes Sphingosin-1-Phosphat die Proliferationsrate der Mesangiumzellen der Ratte verändern kann. Wie die nachfolgende Abbildung 35 zeigt, hat exogen appliziertes Sphingosin-1-Phosphat sowohl auf humane (Abb. 35B), als auch auf Rattenmesangiumzellen (Abb. 35A) keinen proliferationsfördernden Effekt. Auch eine kürzere Stimulationsdauer von 24 Stunden zeigt keine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate mit Sphingosin-1-Phosphat (ohne Abbildung). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass für die Induktion der Proliferation der Mesangiumzellen kein exogenes Sphingosin-1-Phosphat verantwortlich ist. Dennoch besteht weiterhin die Möglichkeit, dass Sphingosin-1-Phosphat nicht über die entsprechenden Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren wirkt, sondern seine Funktion intrazellulär erfüllt. Allerdings ist noch nicht klar, wie eine intrazelluläre Regulation durch Sphingosin-1-Phosphat vonstatten geht, da bisher noch keine Zielproteine beschrieben worden sind.

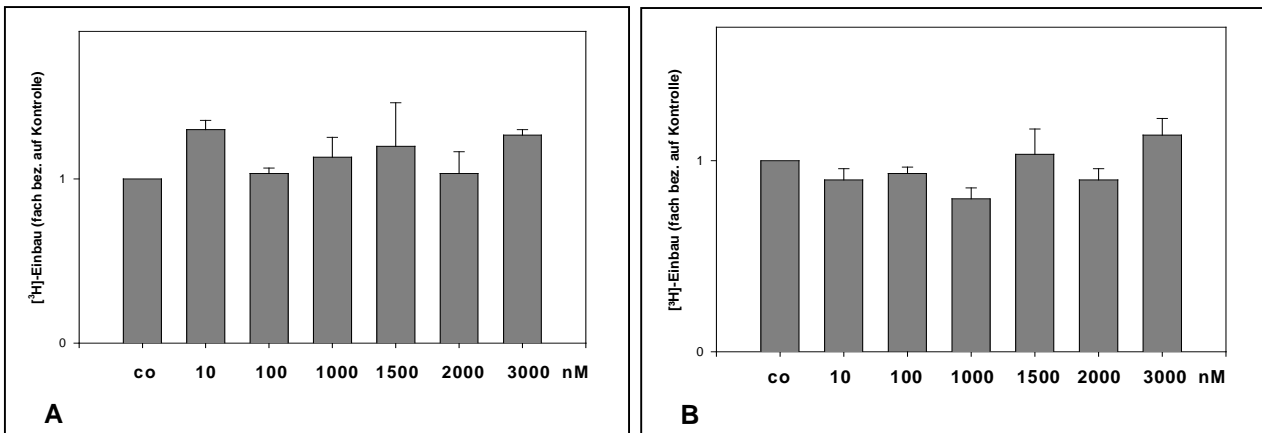


Abb. 35: Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat auf die Proliferation von Mesangiumzellen

Ruhende Mesangiumzellen der Ratte (Abb. 35A) oder des Menschen (Abb. 35B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Sphingosin-1-Phosphat für 48 Stunden in Anwesenheit von [³H]-Thymidin inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und die Inkorporation des [³H]-Thymidin mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt. Die Aktivitätsdaten sind als Prozent der unstimulierten Kontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung (n=6).

Insgesamt läßt sich festhalten, dass die Stimulation der Mesangiumzellen mit extrazellulären Nukleotiden zunächst zu einer verstärkten Promotoraktivität führt, die in einer erhöhten Transkriptions- und Translationsrate der Sphingosinkinase 1 mündet. Die Transkription kann durch Verwendung von Actinomycin D blockiert werden, ebenso wie die Translation durch Cycloheximid. Für diese Prozesse verantwortlich sind durch PKC und MAPK gesteuerte Signalwege, wie die Versuche mit den entsprechenden Inhibitoren zeigen konnten. Darüber hinaus konnte eine Rolle der Sphingosinkinase 1 für die Migration der Mesangiumzellen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu scheint die Sphingosinkinase 1 für die Regulation der durch extrazelluläre Nukleotide induzierbaren Proliferation nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4. Diskussion

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass extrazelluläre Nukleotide, wie ATP und UTP, nicht nur als intrazelluläre Energiequelle von den Zellen genutzt werden, sondern darüber hinaus auch eine wesentliche Rolle als Liganden an Purinrezeptoren spielen. Die damit initiierten Signalkaskaden induzieren zahlreiche unterschiedliche zelluläre Antworten angefangen bei vermehrtem Zellwachstum (Schulze-Lohoff et al., 1992, Huwiler und Pfeilschifter, 1994, Ralevic und Burnstock, 1998) und einer verbesserten Überlebensrate der Zellen (Huwiler et al., 2002, Ahmad et al., 2005) bis hin zu Zellmigration und Chemotaxis. So konnte gezeigt werden, dass Immunzellen, wie z.B. Microglia-Zellen, Oligodendrocyten und unreife dendritische Zellen, auf eine Stimulation mit ATP mit einer erhöhten Migrationsrate reagieren (Honda et al., 2001, Agresti et al., 2005, Idzko et al., 2002). Auch Endothel- und Epithelzellen reagieren auf ATP mit einer verstärkten Migration, was nicht zuletzt bei der Wundheilung und der Gewebeneubildung eine wichtige Rolle spielen könnte (Ehring et al., 2000, Honda et al., 2001, Klepeis et al., 2004). Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass der durch Nukleotide induzierte Signalweg über eine Regulation der Sphingosinkinase 1 mit einem weiteren wichtigen Signalsystem der Zelle, dem Sphingolipid-Signalweg, in Verbindung steht. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, spielen die Sphingolipide, insbesondere Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat, ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle von Zellantworten. Auch dieses Signalsystem ist ubiquitär in allen Zellen verbreitet und in allen Spezies von der Hefe bis zum Menschen konserviert (Ballou et al., 1996, Hannun, 1996, Spiegel et al., 1996, Pena et al., 1997, Renault et al., 2002, Coursol et al., 2003). Während Ceramid eine zentrale Stellung in der zellulären Stressantwort innehat, einschließlich der Kontrolle von Apoptose (Wiesner et al., 1997, Huwiler et al., 1997, Riboni et al., 1995, 1997, Perry und Hannun, 1998, Alesse et al., 1998, Levade und Jaffrézou, 1999, Huwiler et al., 2000, Skulachev, 2001, Maceyka et al., 2002, Pettus et al., 2002), induziert Sphingosin-1-Phosphat vor allem proliferative und zellschützende Prozesse (Olivera und Spiegel, 1993, Gomez-Munoz et al., 1997, Pyne und Pyne, 2000, Uchida et al., 2002). Darüber hinaus konnten einige Gruppen einen Zusammenhang zwischen der Expression der Sphingosinkinase 1 in Tumorzellen und deren Reaktion auf bestimmte Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Etoposid nachweisen. Demnach wird durch diese Substanzen die Expression der Sphingosinkinase 1 reduziert, was die Zellen wiederum anfälliger gegenüber Apoptose machen würde (Taha et al., 2004). Min et al., (2005) konnten nachweisen, dass die Sphingosinkinase in *Dictyostelium discoideum* einen entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität dieser Spezies gegenüber Cisplatin und Carboplatin hat. Die Gruppe konnte zwei unterschiedliche Sphingosinkinase-Gene (*sgkA* und *skgB*) in *Dictyostelium discoideum* identifizieren und gleichzeitig zeigen, dass Nullmutanten ohne diese Enzyme äußerst empfindlich auf die oben genannten

Chemotherapeutika reagieren. Zusatz von Sphingosin-1-Phosphat zu den Nullmutanten oder Überexpression eines der beiden Gene führten zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin und Carboplatin. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in einigen soliden Tumoren eine verstärkte Transkription der Sphingosinkinase 1-mRNA nachweisbar ist (French et al., 2003, Kawamori et al., 2006). Demnach kann von einem auf das Wachstum von Tumoren förderlichen Einfluss der Sphingosinkinase 1 ausgegangen werden. Da dieses Enzym auch wichtige Funktionen bei der Zellproliferation und Angiogenese hat, ist eine genaue Untersuchung der Regulation dieses Enzyms nicht nur für die Entwicklung neuer Krebstherapien, sondern auch für ein besseres Verständnis von Wundheilungsprozessen sicherlich wünschenswert.

4.1 Regulation der Aktivität der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase durch extrazelluläre Nukleotide

Wie bereits in den Ergebnissen beschrieben, folgt die Aktivierung der Sphingosinkinase 1 in den renalen Mesangiumzellen der Ratte nach Stimulation mit ATP oder UTP einer zweiphasischen Kinetik. Bereits wenige Minuten nach Zugabe des Stimulus kann eine erhöhte Aktivität des Enzyms in einem *in vitro* Sphingosinkinaseassay nachgewiesen werden. Diese sehr schnelle Aktivierung kann nur durch posttranslationale Modifikationen des Proteins, wie Phosphorylierungen, erklärt werden. Tatsächlich enthält die Aminosäuresequenz der Sphingosinkinase 1 der Ratte zahlreiche mögliche Phosphorylierungsstellen.

```
MQPADCPRGLLPRPCRVLVLLNPRGGKALKLQSRVRLLEEEAEVSFKLMLTERQNHARELV  
CAEELGHWDALAVMSGDGLMHEVVNGLMERPDWESAIQKPLCSLPGGSGNALAASLNYYAGHEQ  
VTNEDLLINCTLLCCRQLSPMNLSSLHTASGRQLYSVLSLSWGFVADVDLESEKYRSLGEIRF  
TVGTFRLASLRIRYQQQLAYLQVKAASKIPASSLAQKGPANTYLVPLEEPVPPHWTVVPEQDF  
VLVLVLLHHLSTEMFAAPMGRCEAGVMHLFYIRAGVSRAMLLRFLAMQKKGKHMDDLDCPYLVH  
VPVVAFRLEPRNQRGVFVSDGELMVCEAVQGVHPNYLWMVSGSSDPSGRDSQRRPPPEEPI
```

Abb. 36: Mögliche Phosphorylierungsstellen der Sphingosinkinase 1 der Ratte (rSPHK 1)

Die Abbildung gibt einen kurzen Überblick über einige Phosphorylierungsstellen in der Aminosäuresequenz der Sphingosinkinase 1 der Ratte. Rot markiert sind die PKC-Phosphorylierungsstellen, blau die ERK-Motive.

In diesem Zusammenhang bedeutsam ist der Nachweis, dass in der humanen Form der Sphingosinkinase 1 Ser²²⁵ nach Stimulation von HEK293-Zellen mit Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder TPA vermehrt phosphoryliert wird, was gleichzeitig zu einer Translokation der Sphingosinkinase 1 vom Zytosol zur Zellmembran führt (Pitson et al., 2000, 2003, 2005). Bei

dem dabei untersuchten Motiv handelt es sich um eine ERK-Phosphorylierungsstelle. Daneben konnten im humanen System vier mögliche PKC-Phosphorylierungsmotive identifiziert werden (Pitson et al., 2000), die auch in Maus und Ratte konserviert vorliegen. Johnson et al. (2002) konnten zeigen, dass nach Stimulation von HEK293-Zellen mit dem PKC-Aktivator TPA ebenfalls eine Translokation der Sphingosinkinase 1 zur Plasmamembran stattfindet. Ein direkter Nachweis der Phosphorylierung eines der vier bekannten PKC-Motive konnte jedoch weder von dieser noch anderen Gruppen erbracht werden (Buehrer et al., 1996, Shu et al., 2002). Dennoch konnte die Gruppe um Johnson et al. (2002) zeigen, dass die Translokation unterbleibt, wenn die Zellen mit PKC-Inhibitoren vorbehandelt wurden. Untersuchungen in Rattenzellen stehen bislang noch aus. Interessant wäre die Mutation verschiedener möglicher PKC- und ERK-Phosphorylierungsstellen innerhalb der Sequenz der Sphingosinkinase 1 der Ratte (z.B. von Ser¹⁴⁸, Thr¹⁹⁵, Ser²²⁵) gewesen, gefolgt von *in vitro* Phosphorylierungsstudien. Zusätzlich von Interesse wäre eine Analyse des schnellen Aktivitätsanstiegs mit Hilfe der bereits bekannten PKC- und ERK-Inhibitoren. Es wäre zu erwarten, dass der Einsatz dieser Substanzen dazu führt, dass der schnelle Aktivierungsschritt durch Phosphorylierung unterbleibt.

Einen zweiten Anstieg der Aktivität der Sphingosinkinase 1 kann man nach mehreren Stunden feststellen. Dieser Anstieg wiederum kann auf transkriptionelle Mechanismen zurückgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl nach Stimulation der Mesangiumzellen mit ATP als auch mit UTP eine verstärkte Transkription der *rSPHK 1*-mRNA nachgewiesen werden kann. Nachfolgend erhöht sich durch *de novo* Proteinsynthese der Gehalt an Sphingosinkinase 1 in den Zellen. Die vermehrte Transkription ist auf eine Aktivierung des zugehörigen Promotors zurückzuführen. Der humane Promotor wurde 2003 erstmals von Nakade et al. kloniert. Die Gruppe konnte in der humanen Leukämiezelllinie MEG-O1 eine Aktivierung des humanen Promotors durch den PKC-Aktivator TPA nachweisen. Innerhalb der in dieser Publikation beschriebenen Promotorsequenz konnten zahlreiche mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Dazu gehören unter anderem Bindestellen für AP-1, AP-2, AP-4, Sp1 und NFκB (nuclear factor κ B). Interessanterweise konnte in humanen Endothelzellen eine Aktivierung des humanen Promotors nicht nur mit TPA sondern auch mit Histamin induziert werden (Huwiler et al., 2006). Darüber hinaus konnte in MCF-7-Zellen gezeigt werden, dass Applikation von extrazellulären Nukleotiden zu einer erhöhten Aktivität des Promotors der humanen Sphingosinkinase 1 führt (F. Döll, unveröffentlichte Daten). Auch für den Promotor der Sphingosinkinase 1 konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass extrazelluläre Nukleotide in der Lage sind, eine Aktivierung des Promotors auszulösen. Eine genauere Analyse des Promotors bezüglich der dafür verantwortlichen Transkriptionsfaktoren steht noch aus. Eine Analyse der Nukleotidsequenz zeigt aber

zahlreiche Bindestellen von Transkriptionsfaktoren, die für die beobachteten Effekte verantwortlich sein können. So findet man ähnlich wie im Promotor der humanen Sphingosinkinase 1 auch im Promotor des Rattenzym Bindestellen für AP-1, AP-2, AP-4, Sp1 und NFκB (nuclear factor κ B). Zur Funktionalität dieser Bindestellen gibt es noch wenige Untersuchungen. Dennoch konnten Sobue et al. (2005) zeigen, dass in Phaeochromocytomzellen der Ratte der Promotor der Sphingosinkinase 1 durch NGF (nerve growth factor) in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor Sp1 (specificity protein 1) aktiviert werden kann.

Der zweite zu beobachtende Aktivitätsanstieg kann durch die Verwendung von PKC- und ERK- Inhibitoren, sowie Cycloheximid unterdrückt werden. Dies deutet auf eine Beteiligung der oben genannten Signalwege für die Aktivierung des Sphingosinkinase 1-Promotors hin, die dann zu einer Proteinneusynthese führt, die in Anwesenheit von Cycloheximid jedoch unterbleibt. Die Verwendung von Actinomycin D, einem bekannten Inhibitor der Transkriptionsmaschinerie, verhindert ebenso den zweiten Aktivitätsanstieg der Sphingosinkinase 1, da bereits die mRNA-Synthese unterbleibt. Da die mRNA der Sphingosinkinase 1 zudem nur eine relativ geringe Halbwertszeit von ca. 20 Minuten hat, erklärt dies auch die fehlende Aktivitätssteigerung. In renalen Mesangiumzellen konnte bereits gezeigt werden, dass ATP unterschiedliche Signalwege initiieren kann. So kann man nach ATP-Stimulation eine Aktivierung der Phospholipase C beobachten, was zur Bildung von 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) führt (Pfeilschifter, 1990a, b). Dies wiederum induziert die Freisetzung von intrazellulärem Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum, das über IP₃-Rezeptoren verfügt (Pavenstädt et al., 1993). Darüber hinaus konnten die Aktivierung verschiedener Proteinkinase C-Isoenzyme (Pfeilschifter und Huwiler, 1996), der klassischen mitogenaktivierten Kinasen (MAPKs) (Huwiler und Pfeilschifter, 1994), der stressaktivierten Kinase (Huwiler et al., 1997a, b), der c-Jun N-terminalen Proteinkinase (Huwiler et al., 1997a, b), der p38-MAPK (Huwiler et al., 2000a) und der Proteinkinase B/Akt (Huwiler et al., 2002) nachgewiesen werden. Funktionell führt die Stimulation mit extrazellulären Nukleotiden über die Aktivierung einer cytosolischen Phospholipase A₂ zur Bildung von Prostaglandin E₂ (Pfeilschifter, 1990a). Daneben konnte die Induktion der Proliferation (Schulze-Lohoff et al., 1992, Huwiler und Pfeilschifter, 1994) und eine Schutzfunktion vor stressinduzierter Apoptose nachgewiesen werden (Huwiler et al., 2002). Im Licht dieser Daten vermuten wir, dass die Stimulation mit extrazellulären Nukleotiden über die Aktivierung des PKC- und des klassischen MAPK-Signalweges zur Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren führt, die dann die Promotoraktivität der Sphingosinkinase 1 modifizieren. Unter den bisher in der Literatur beschriebenen Purinrezeptoren gibt es verschiedene mögliche Kandidaten, die für die von uns beobachteten Effekte verantwortlich sein können.

Die generelle Schwierigkeit bei der Bestimmung, welcher Rezeptortyp nun für die beobachtbaren Effekte verantwortlich ist, liegt zum einen darin begründet, dass es für die unterschiedlichen Subtypen keine wirklich selektiven Antagonisten gibt. Vielmehr inhibieren bestimmte Antagonisten ganze Klassen von Purinrezeptoren. Erschwerend hinzu kommt, dass in einer Zelllinie erhaltene Ergebnisse sich nicht ohne weiteres auf andere Zelllinien oder gar Gewebe übertragen lassen. Zudem können mehrere Purinrezeptoren gleichzeitig in einer Zelllinie exprimiert werden und die beobachteten Effekte durch Integration zustande kommen. So können sowohl P2Y₂- als auch P2Y₄-Rezeptoren durch UTP aktiviert werden, P2Y₆-Rezeptoren dagegen durch UDP, einem Abbauprodukt von UTP (Ralevic und Burnstock, 1998). Durch ATP können ebenso sowohl P2Y₂- als auch P2Y₄-Rezeptoren aktiviert werden (Rice et al., 1995, Chen et al., 1996b, Bogdanov et al., 1998). Daher ist die Bestimmung, welcher dieser drei Typen nun in einer bestimmten Zelllinie für einen bestimmten Effekt verantwortlich ist äußerst schwierig, solange keine selektiven Antagonisten vorhanden sind. Zusätzlich könnten auch Abbauprodukte der verwendeten Nukleotide für die auftretenden Effekte verantwortlich sein. Durch die Verwendung verschiedener Nukleotidanaloga und Abbauprodukte von ATP und UTP können zumindest einige Rezeptoren ausgeschlossen werden. P1-Rezeptoren scheiden aufgrund der fehlenden Aktivierung der Sphingosinkinase 1 durch P1-Rezeptoragonisten wie NECA, S- und R-PIA, sowie aufgrund des fehlenden Pertussistoxineffekts aus. Gleiches trifft zu für die große Familie der Ionenkanal-gekoppelten P2X-Rezeptoren. Allen diesen Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie vor allem von ATP aktiviert werden. Dies könnte nun die durch ATP-Stimulation hervorgerufenen Effekte erklären, nicht jedoch die durch UTP induzierten. Zusätzlich sind alle diese Rezeptoren Suramin-sensitiv. Damit scheiden sie als Kandidaten für unser Modellsystem aus, da dort eben kein oder nur ein sehr geringer inhibitorischer Einfluss von Suramin nachweisbar war.

Im Gegensatz zur Aktivierung der Sphingosinkinase 1, die vor allem durch ATP und UTP induziert werden kann, wird die Sphingosinkinase 2 hauptsächlich durch Abbauprodukte von ATP, insbesondere durch AMP und Adenosin, aber auch durch UTP und seine Abbauprodukte aktiviert. Auch hier stellt sich die Frage, welcher Purinrezeptor für die beobachtete Aktivitätssteigerung der Sphingosinkinase 2 verantwortlich sein könnte. Die deutliche Aktivierung der Sphingosinkinase 2 durch das ATP-Abbauprodukt Adenosin deutet stark darauf hin, dass in diesem Falle ein P1-Rezeptor involviert ist. Interessant wären in diesem Zusammenhang weitergehende Untersuchungen mit Agonisten verschiedener P1-Rezeptoren, sowie spezifischer P1-Rezeptorantagonisten. Daneben kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch P2Y-Rezeptoren für die Aktivierung der Sphingosinkinase 2 in den Mesangiumzellen verantwortlich sind. Mögliche Kandidaten dafür sind der P2Y₄- und der P2Y₆-Rezeptor. Die Rolle eines P2X-Rezeptors kann dagegen in

diesem Fall ausgeschlossen werden, da diese Rezeptoren hauptsächlich durch ATP aktiviert werden, dieses Nukleotid aber für die Aktivierung der Sphingosinkinase 2 keine Rolle spielt.

Auch die neutrale Ceramidase unterscheidet sich in ihrem Aktivierungsmuster deutlich von dem der Sphingosinkinase 1 oder der Sphingosinkinase 2. Die neutrale Ceramidase wird vor allem durch Nukleotidanalogue wie Bz-ATP, $\alpha\beta$ -Me-ATP oder das stabile ATP-Analog γ S-ATP aktiviert. Darüber hinaus induziert auch der PKC-Agonist TPA eine sehr ausgeprägte Aktivitätsteigerung der neutralen Ceramidase. Auch hier kann, wie bei der Sphingosinkinase 1 die Involvierung eines P1-Rezeptors weitgehend ausgeschlossen werden, da eine Stimulation der neutralen Ceramidase durch Adenosin unterbleibt. Die durch Stimulation mit Bz-ATP zu beobachtende Aktivierung wiederum kann möglicherweise auf den P2X₇-Rezeptor zurückgeführt werden, da dieser Ionenkanal-Rezeptor bevorzugt durch Bz-ATP aktiviert werden kann (Surprenant et al., 1996). Da dieser Rezeptor ebenfalls durch Stimulation mit ATP aktiviert wird, könnte sich die Wirkung von γ S-ATP auf die Aktivität der neutralen Ceramidase ebenfalls durch die Bindung an einen P2X₇-Rezeptor erklären lassen. Darüber hinaus konnte für medulläre vestibuläre Nuklei gezeigt werden, dass auch $\alpha\beta$ -Me-ATP in der Lage ist, die Signalübertragung dieser Zellen über einen P2X-Rezeptor zu erhöhen (Chessel et al., 1997). Die Aktivierung eines P2X₇-Rezeptors resultiert in einer schnellen Depolarisierung der Zellmembran und Einstrom von Kationen in die Zelle. In humanen und murinen Makrophagen konnte eine Aktivierung der Phospholipase D nach Stimulation des P2X₇-Rezeptors nachgewiesen werden (el-Moatassim und Dubyak, 1992, 1993; Humphreys und Dubyak, 1996). Möglicherweise liegt der Aktivierung der neutralen Ceramidase in Mesangiumzellen ein ähnlicher Mechanismus zugrunde. Die Wirksamkeit von UMP liegt möglicherweise wiederum in der Aktivierung des P2Y₄-Rezeptors, der uridinnukleotidspezifisch ist.

Die in dieser Dissertation beschriebene zweiphasische Regulation der Sphingosinkinase 1 kann sowohl eine kurzzeitige, schnelle Anpassung an zelluläre Bedürfnisse durch ein „Fine-Tuning“ mittels der Phosphorylierung als auch eine längerfristige Adaption an Umweltveränderungen garantieren, denen mit einer veränderten Genexpression begegnet werden kann. Eine solche Regulation könnte auch für die Wundheilung nach einer Verletzung von Vorteil sein. Der nachfolgende Abschnitt befasst sich daher vor allem mit der Rolle der Sphingosinkinase 1 in den für die Wundheilung und das „Gewebe-Remodelling“ erforderlichen zellulären Prozessen und stellt dabei die Migration und Proliferation von Zellen im allgemeinen und von renalen Mesangiumzellen im Besonderen in den Mittelpunkt der Diskussion.

4.2 Funktion der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei der Migration von renalen Mesangiumzellen

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele dafür, dass ATP in verschiedensten Zelltypen in der Lage ist, Migration oder Chemotaxis zu induzieren. So konnten Honda et al. (2001) zeigen, dass ATP die Migration von Microgliazellen zu induzieren vermag. Weitere promigratorische Effekte konnten auch in Oligodendrocyten (Agesti et al., 2005), unreifen dendritischen Zellen (Idzko et al., 2002, la Sala et al., 2002), Monocyten (Kaufmann et al., 2005), Mastzellen (McCloskey et al., 1999), HUVEC (human umbilical vein cell; Kaczmarek et al., 2005) und vielen weiteren Zelltypen nachgewiesen werden. Die durch ATP induzierte Migration von zahlreichen Endothel- und Epithelzellen mag eine wichtige Funktion bei der Wundheilung und dem Gewebe-Remodelling spielen (Ehring et al., 2000, Honda et al., 2001, Klepeis et al., 2004). Darüber hinaus konnte auch für UTP eine solche pro-migratorische Wirkung in HUVEC (Kaczmarek et al., 2005), hämatopoietischen Stammzellen (Rossi et al., 2007), glatte Gefäßmuskelzellen der Aorta (Chaulet et al., 2001; Pillois et al., 2002) und Astrocyten (Wang et al., 2005) nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass auch die Mesangiumzellen der Niere auf Stimulation mit ATP und UTP mit einer erhöhten Migrationsrate reagieren. Die Migration von Mesangiumzellen ist von Bedeutung bei den Reparaturmechanismen, die während entzündlicher Erkrankungen der Niere ablaufen, um die Entzündungsreaktionen zu beenden. Oftmals kann man bei solchen entzündlichen Nierenerkrankungen in einer ersten akuten Entzündungsphase eine erhöhte Apoptoserate bei den Mesangiumzellen beobachten. Um die Funktionalität des gesamten Malpighi-Körperchens aufrecht zu erhalten, muss dieser Verlust ausgeglichen werden. Mögliche Mechanismen stellen dabei die Migration von Mesangiumzellen aus nicht betroffenen Bereichen des Glomerulus und die Proliferation der noch im entzündeten Bereich vorhandenen oder neu eingewanderten Mesangiumzellen dar. ATP oder auch UTP könnten in diesem Geschehen durch die apoptotischen Mesangiumzellen in den Extrazellularraum freigesetzt werden. Darüber hinaus ist eine im Rahmen des Entzündungsgeschehens ablaufende aktive Freisetzung von Nukleotiden aus Immunzellen ebenso denkbar. Diese Freisetzung kann entweder auf mechanische Stimulation hin erfolgen, wie sie z.B. für Fibroblasten (Grierson und Meldolesi, 1995), COS-7 und HEK293-Zellen (Ostrom et al., 2000) nachgewiesen werden konnte. Daneben konnte aber auch gezeigt werden, dass die Freisetzung dieser Nukleotide durch Agonisten, wie z.B. mit Bradykinin aus Endothelzellen, erfolgen kann (Buxton et al., 2001). Die so freigesetzten Nukleotide könnten dann ihrerseits auf autokrine Art und Weise auf die Purinrezeptoren der Mesangiumzellen einwirken und dabei die Migration und Proliferation dieser Zellen auslösen und damit Anteil an den

Reparaturmechanismen der Niere nehmen. Die Beteiligung von Purinrezeptoren an entzündlichen Erkrankungen der Niere wurde auch von Rost et al. (2002) vorgeschlagen. In einem Glomerulonephritis-Modell, der Anti-Thy1-Glomerulonephritis in Ratten, konnte die Gruppe zeigen, dass der P2Y-Rezeptor-Antagonist PPADS in der Lage ist, den Verlauf dieser Erkrankung abzumildern. Eine Beteiligung von Purinrezeptoren bei der Entstehung bestimmter Krebserkrankungen konnte ebenfalls von zahlreichen Gruppen gezeigt werden. So konnten Dixon et al. (1997) zeigen, dass Nukleotide in der Lage sind, das Wachstum von Brustkrebszellen (MCF-7-Zellen) zu induzieren und dass dies über den P2Y₂-Rezeptor vermittelt wird. Daneben gibt es in der Literatur auch zahlreiche Untersuchungen bezüglich einer antiproliferativen Wirkung von ATP. Bereits 1998 wiesen Höpfner et al. diese antiproliferative Wirkung von ATP in der Dickdarmkrebszelllinie HAT 29 nach und zeigten, dass dieser Effekt auf der Expression des P2Y₂-Rezeptors beruht. Bezüglich Krebserkrankungen der Niere und deren Reaktionen auf extrazelluläre Nukleotide liegen noch keine gesicherten Daten vor. Dagegen wurde schon von einigen Gruppen der Einfluss der Aktivierung verschiedener Purinrezeptoren auf die Migration unterschiedlicher Zellen untersucht. So konnten Wang et al. (2005) zeigen, dass die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors sowohl durch ATP als auch durch UTP in Astrozyten die Migration induzieren kann. Die Depletion dieses Rezeptors durch siRNA konnte die Migration nach Stimulation mit UTP komplett unterdrücken. Darüber hinaus konnte diese Gruppe nachweisen, dass die Stimulation dieses Zelltyps mit UTP zu einer verstärkten Expression von $\alpha_v\beta_{3/5}$ -Integrinen führt, von denen bekannt ist, dass sie direkt mit dem P2Y₂-Rezeptor interagieren und dadurch seine Funktion modulieren können. Wang et al. (2005) konnten darüber hinaus zeigen, dass die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors über den PI3-Kinase- und Akt/PKB-Signalweg, sowie über den klassischen MAPK-Signalweg erfolgt und so die Migration der Astrozyten induzieren kann. Auch für die Mesangiumzellen konnte im Rahmen dieser Dissertation eine Involvierung der MAPK-Signalkaskade, sowie einer Proteinkinase C nachgewiesen werden, da Inhibitoren dieser Signalwege in der Lage waren, die Migration sowohl durch ATP als auch durch UTP zu unterdrücken. Bereits 1996 konnten Verghese et al. zeigen, dass auch humane Neutrophile auf Stimulation mit ATP oder UTP mit Migration reagieren und dieser Effekt auf den P2Y₂-Rezeptor zurückgeführt werden kann. Darüber hinaus wurde bereits 1989 von Cowen et al. ein Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels nach der Applikation dieser Nukleotide ausgelöst durch Aktivierung einer Phospholipase C in den humanen Neutrophilen gezeigt. Da ATP und UTP in hohen Konzentrationen während der Aggregation von Blutplättchen freigesetzt werden (Cowen et al., 1989) und die Neutrophilen der erste Zelltyp ist, der in verletztem Gewebe eintrifft, schlossen Verghese et al. (1996) aus den Ergebnissen ihrer Experimente, dass Nukleotide für die Induktion der Migration dieses Zelltyps von besonderer Bedeutung sind. Oshimi et al. (1999) konnten

diese Ergebnisse für humane Makrophagen bestätigen, McCloskey et al. (1999) für Mastzellen der Ratte.

Interessant in diesem Zusammenhang ist ebenso, dass auch Sphingosin-1-Phosphat die Migration verschiedenster Zelltypen beeinflussen kann. Balthasar et al. (2006) untersuchten das migratorische Verhalten verschiedener Schilddrüsenkrebsarten nach Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat. Je nach Expression der unterschiedlichen S1P-Rezeptoren war die Wirkung verschieden. Die Zelllinien, die den S1P₁- und den S1P₃-Rezeptor exprimierten, zeigten nach Gabe von Sphingosin-1-Phosphat eine verstärkte Migration. Zelllinien, die den S1P₂-Rezeptor besaßen, wurden dagegen in ihrer Migration gehemmt. Dies stimmt überein mit der Erkenntnis, dass S1P₁- und S1P₃-Rezeptor eher die Migration induzieren, während der S1P₂-Rezeptor eher inhibierend wirkt (Takuwa, 2002, Malchinkhuu et al., 2005, Yamaguchi et al., 2003, Czeloth et al., 2005). S1P-Rezeptoren modulieren die Migration verschiedener Zellen mit Hilfe der Rho-Familie der kleinen G-Proteine (Takuwa, 2002, Taha et al., 2004). Die durch die S1P₁- und S1P₃-Rezeptoren induzierte Migration wird vermittelt durch die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), Akt/PKB und Rho (Taha et al., 2004). Der S1P₂-Rezeptor ist ebenfalls G-Protein gekoppelt (G_{12/13}), aktiviert Rho und inhibiert dadurch die Signalweiterleitung über Rac. Dies führt zu einer Inhibierung der Migration durch Sphingosin-1-Phosphat (Taha et al., 2004, Yamaguchi et al., 2003). Lepley et al. (2005) konnten zeigen, dass für diesen Effekt die Inhibierung von Rac nicht unbedingt erforderlich ist. Der S1P₄-Rezeptor ist hauptsächlich auf Immunzellen zu finden (Anliker et al., 2004); für diesen Rezeptor konnte in transfizierten CHO-Zellen (Chinese hamster ovary cells) ein pro-migratorischer Effekt durch Aktivierung von Cdc 42 nachgewiesen werden (Kohno et al., 2003). Die Wirkung der Stimulation des S1P₅-Rezeptors muss noch näher charakterisiert werden.

Ganz allgemein spielt auch Sphingosin-1-Phosphat eine wichtige Rolle bezüglich des Wachstums von Krebszellen und der Metastasenbildung (Ogretmen und Hannun, 2004). Es gibt allerdings auch Berichte über anti-metastatische Wirkungen von Sphingosin-1-Phosphat. In Mausmelanomzellen konnte durch Sphingosin-1-Phosphat *in vivo* die Metastasenbildung unterdrückt werden (Yamaguchi et al., 2003). Daneben konnten zahlreiche Gruppen entweder antimigratorische Effekte von Sphingosin-1-Phosphat, wie z.B. in C2C12 Myoblasten, B16 Mausmelanomzellen, humanen Neutrophilen und während der Herzentwicklung (Becciolini et al., 2006, Sadahira et al., 1994, Kawa et al., 1997, Wendler et al., 2006) oder aber pro-migratorische Wirkungen, wie z.B. in HEK293-Zellen, embryonalen Mausfibroblasten, humanen Gefäßmuskelzellen, humanen multiformen Glioblastomazellen und einigen Magenkrebszelllinien, (Rosenfeldt et al., 2001, van Brocklyn et al., 2003, Yamashita et al., 2005) nachweisen. In unserem Modellsystem konnte ebenfalls ein pro-

migratorischer Effekt von Sphingosin-1-Phosphat nachgewiesen werden. Sowohl die humanen als auch die Mesangiumzellen der Ratte zeigen eine dosisabhängige Induktion der Migration in Anwesenheit von Sphingosin-1-Phosphat. Interessant in diesem Zusammenhang war nun die Frage, ob die durch extrazelluläre Nukleotide und die durch Sphingosin-1-Phosphat induzierbare Migration unabhängig voneinander auftreten oder über die Regulation der Aktivität der Sphingosinkinase 1 in den Mesangiumzellen miteinander verknüpft sind. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Migration nach Stimulation mit ATP und UTP unterbleibt, wenn die mRNA der Sphingosinkinase 1 durch den Einsatz von siRNA depletiert worden ist, oder aber bei Verwendung von Sphingosinkinase 1-defizienten Mausmesangiumzellen.

Die Bedeutung der Sphingosinkinase 1 für die Migration wird auch dadurch unterstrichen, dass die Verwendung von PKC- und MAPK-Inhibitoren die Migration der Mesangiumzellen nach Stimulation mit extrazellulären Nukleotiden unterbinden kann. Da bei Verwendung dieser Inhibitoren die für die Aktivitätssteigerung erforderlichen Signalwege blockiert werden, kann die Transkription und Translation der Sphingosinkinase 1 nicht stattfinden und entsprechend nicht vermehrt Sphingosin-1-Phosphat gebildet werden. Von Bedeutung für die Migration erscheint im Licht der hier erhaltenen Daten vor allem der zweite Aktivitätsanstieg der Sphingosinkinase 1. Zum einen führt die Depletion der Sphingosinkinase 1 zum vollständigen Verlust der Migrationsfähigkeit. Darüber hinaus kann durch die Applikation von Cycloheximid, das die Translation von Proteinen inhibiert, die Migrationsfähigkeit der Zellen nach Stimulation mit extrazellulären Nukleotiden zumindest teilweise blockiert werden. Da es jedoch nicht möglich ist, die erste Aktivierungsphase von der zweiten komplett zu trennen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erste Aktivierung erforderlich ist, um die zweite zu initiieren.

Neben der vielfach beschriebenen Involvierung von Sphingosin-1-Phosphat bei der Zellmigration wurde auch die Beteiligung der Sphingosinkinase 1 selbst schon nachgewiesen. So konnten Döll et al. (2005) in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigen, dass der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression in Brusttumoren spielt, die Sphingosinkinase 1 aktivieren konnte. Sarkar et al. (2005) konnten zeigen, dass EGF nach der Aktivierung der Sphingosinkinase 1 zu einer Translokation dieses Enzyms zur Plasmamembran beiträgt, wie sie in ähnlicher Weise auch von Pitson et al. (2002, 2005) für die humane Form nachgewiesen wurde. Die Gruppe konnte darüber hinaus auch zeigen, dass die Aktivität der Sphingosinkinase 1 wichtig für die Migration der MCF-7-Zellen ist, da die Herunterregulation der Genexpression dieses Enzyms das Zellwachstum, die Migration und auch die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Doxorubicin negativ beeinflusst. Kaneider et al. (2002) untersuchten die Wirkung von TPA

auf das Migrationsverhalten von humanen Neutrophilen, Monocyten und Lymphocyten. Sie konnten eine chemotaktische Wirkung dieses PKC-Aktivators nachweisen. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass die Aktivierung der Sphingosinkinase 1 vermutlich ein essentieller Schritt für die Migration der Zellen darstellt, da die Inkubation mit Dimethylsphingosin, einem unselektiven Inhibitor der Sphingosinkinase 1, den TPA-Effekt unterbinden konnte. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei Stimulation mit Thrombin beobachtet werden. Die Autoren schlossen daraus, dass die Aktivierung der Sphingosinkinase 1 durch die Proteinkinase C zur Bildung von Sphingosin-1-Phosphat führt, das wiederum über Bindung an die entsprechenden S1P-Rezeptoren die Migration der Leukozyten auslöst. Die gleiche Gruppe konnte 2005 nachweisen, dass das Prionprotein ein Chemoattraktant für unreife dendritische Zellen, abgeleitet von Monocyten, ist. Auch hier konnten Kaneider et al. (2005) eine Verbindung zur Aktivität der Sphingosinkinase 1 herstellen, da ebenso in diesem Zellsystem die Verwendung von Dimethylsphingosin in der Lage war, die Migration der Zellen zu blockieren. Demnach spielt die Sphingosinkinase 1 bei der Regulation der Migration vieler unterschiedlicher Zelltypen eine wichtige Rolle. Unter anderem scheint ihr Einfluss auf die Entstehung oder Progression von Krebs recht groß zu sein, worauf in einem späteren Kapitel näher eingegangen werden soll.

Über die Rolle der Sphingosinkinase 2 für die Migration ist noch wenig bekannt. Hait et al., (2005) konnten jedoch für die Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 nachweisen, dass die Sphingosinkinase 2 zumindest für diese Zelllinie für die durch EGF induzierte Migration von Bedeutung ist. Die Gruppe konnte zeigen, dass die Herunterregulation der Expression der Sphingosinkinase 2 in diesem Zelltyp die chemotaktische Bewegung in Richtung des Stimulus EGF stoppen kann. In HEK293-Zellen konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Ebenso wenig konnten die Daten von Döll et al. (2005) in MCF-7-Zellen bestätigt werden. Darüber hinaus spielt die Sphingosinkinase 2 eine wesentliche Rolle bei der Phosphorylierung von FTY720 (Zemann et al., 2006). Die phosphorylierte Form dieser Verbindung ist ein Agonist am S1P₁-Rezeptor, der bei der Rekrutierung von Lymphozyten eine wesentliche Rolle spielt. Die Aktivierung dieses Rezeptors durch die phosphorylierte Form von FTY720 führt zu einer Herunterregulation der Rezeptorexpression des S1P₁-Rezeptors (Desensibilisierung) in den Lymphozyten (Kharel et al., 2005). Da die Lymphozyten nach Bindung von Sphingosin-1-Phosphat an diesen Rezeptorsubtyp normalerweise die sekundären Lymphorgane verlassen, führt die Herunterregulation dazu, dass die Lymphozyten nicht mehr auf ihren „natürlichen“ Liganden reagieren können und deshalb in den sekundären Lymphorganen verharren. FTY720 wurde als Immunsuppressivum nach Nierentransplantationen in klinischen Studien verwendet, musste jedoch aufgrund verschiedener, z.T. schwerwiegender Nebenwirkungen für diese Indikation aufgegeben werden. Eine neue Indikation für FTY720 ist jedoch die Behandlung der

Multiplen Sklerose. In unseren Versuchen hatte die Depletion der Sphingosinkinase 2 mit Hilfe von siRNA keinen signifikanten Einfluss auf die Migrationsrate der Mesangiumzellen.

Die Funktion der neutralen Ceramidase bei der Regulation der Migrationsfähigkeit von Zellen ist noch weitgehend unklar. Falluel-Morel et al. (2005, 2006) konnten jedoch nachweisen, dass Ceramid für die Migration der sogenannten granulären Zellen („granule cells“) an die richtige Position im Kleinhirn von Bedeutung ist. Unter Verwendung des membrangängigen C2-Ceramids konnte die Gruppe zeigen, dass dieses Ceramid unter Kurzzeitstimulation die Migration der Zellen anregen und die Ausbildung von Neuriten blockieren konnte. Diese erhöhte Motilität der Zellen durch C2-Ceramid ging einher mit Reorganisationen des Zytoskeletts, wie z.B. der Deorganisation von Aktinfilamenten und der Depolarisation von Tubulin. Unter Langzeitstimulation kehrte sich dieser Effekt um; C2-Ceramid führte dann zu einer Verringerung der Migrationsfähigkeit und zum Auftreten von Apoptose.

4.3 Funktion der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei der Proliferation von renalen Mesangiumzellen

Die Rolle von extrazellulären Nukleotiden bei der Proliferation zahlreicher Zelllinien ist ausführlich untersucht worden. Es wird allgemein akzeptiert, dass extrazelluläre Nukleotide die Proliferation in einer Vielzahl von Zelltypen fördern kann. So konnte eine verstärkte Proliferation nach Stimulation mit ATP oder UTP in C₆- und anderen Gliomzellen (Tu et al., 2000; Morrone et al., 2003), in humanen Keratinozyten (Lee et al., 2001), in Zellen der Retina (Sanches et al., 2002), glatten Muskelzellen der Atmenwege (Michoud et al., 2002), in verschiedenen Lungenkrebszelllinien (Schäfer et al., 2003) und in humanen neuronalen Stammzellen (Milosevic et al., 2006) nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Dissertation konnten die von Schulze-Lohoff et al. (1992) und Huwiler und Pfeilschifter (1994) publizierte Ergebnisse an Mesangiumzellen bestätigt werden, wonach ATP und UTP die Proliferation sowohl in humanen als auch in Mesangiumzellen der Ratte induzieren können. Die in unseren Studien erhaltenen Daten zeigen jedoch, dass die Depletion der Sphingosinkinase 1 in den Rattenmesangiumzellen keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen nach Stimulation mit den extrazellulären Nukleotiden hat. Interessanterweise führte die Depletion der Sphingosinkinase 2 zumindest bei der Stimulation mit UTP zu einer stark erhöhten Proliferation der Mesangiumzellen der Ratte. Ob die Sphingosinkinase 2 tatsächlich eine negative regulatorische Funktion bei der durch UTP stimulierten Proliferation ausübt, muss jedoch noch weiter abgeklärt werden. Die Depletion der neutralen Ceramidase scheint ebenfalls keine Wirkung auf die Proliferationsrate nach ATP-Stimulation zu haben. Im Gegensatz dazu nimmt die Proliferationsfähigkeit der Zellen nach Depletion der neutralen Ceramidase mit siRNA unter UTP-Stimulation ab. Dies ist womöglich auf die Akkumulation

von Ceramid in den Zellen zurückzuführen, das nach Wegfall der neutralen Ceramidase nicht weiter zu Sphingosin metabolisiert werden kann. Die Rolle der neutralen Ceramidase in der Zellproliferation von Mesangiumzellen wurde von Geoffrey et al. (2004, 2005) untersucht. Geringe Konzentrationen von AGE („advanced glycation end-products“), die *in vivo* bei chronischer Hyperglykämie vermehrt auftreten, führten zu einer vermehrten Expression der neutralen Ceramidase und verbunden damit zu einer erhöhten Proliferationsrate der Zelle. Hohe Konzentrationen von AGE dagegen blockierten die Proliferationsfähigkeit der Zellen und hemmten auch die Expression der neutralen Ceramidase. Die Autoren schlossen daraus, dass AGE in der Lage sind, das Wachstum der Mesangiumzellen durch Regulation der neutralen Ceramidase zu modulieren. Ähnliches konnten auch Xu et al. (2006) für die mit dem Golgi-Apparat assoziierte alkalische Ceramidase (haCer2) zeigen. Depletion dieses Enzyms mit Hilfe von siRNA führte zu einer Repression der Proliferation der untersuchten HeLa-Zellen, was von den Autoren auf eine Akkumulation von Ceramid zurückgeführt wurde. Interessant ist in diesem Zusammenhang ebenso die Tatsache, dass auch die Applikation von Sphingosin-1-Phosphat nicht zu einer verstärkten Proliferation der Zellen geführt hat. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Depletionsversuche der Sphingosinkinase 1 überein. Daher kann eine Rolle der Sphingosinkinase 1 in der durch extrazelluläre Nukleotide induzierten Proliferation ausgeschlossen werden.

Die im Rahmen der Dissertation erhaltenen Daten zur Proliferation stehen im Widerspruch zu den in anderen Zelllinien erhaltenen Daten. Es gibt zahlreiche Publikationen, die einen Einfluss der Sphingosinkinase 1 auch auf die Proliferation nachweisen. So führt die Depletion der Sphingosinkinase 1 in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 zu einer Reduktion sowohl der Migrations- als auch der Proliferationsrate der Tumorzellen (Döll et al., 2005). Kohno et al. (2006) konnten ebenfalls einen Einfluss der Sphingosinkinase 1 auf die Proliferation von Tumorzellen nachweisen. Sie untersuchten die Proliferation von Tumoren des Dünndarms in Sphingosinkinase 1-defizienten Mäusen. Die Gruppe beobachtete in den Sphingosinkinase 1-defizienten Mäusen eine reduzierte Tumorgroße und eine reduzierte Proliferationsrate in den betroffenen Epithelzellen. Alle S1P-Rezeptoren wurden in den Sphingosinkinase 1-defizienten Mäusen normal exprimiert und auch die Größe und Anzahl der Polypen war in S1P-Rezeptor-defizienten Mäusen unverändert; die Autoren schlossen daraus, dass die Rezeptoren und exogenes Sphingosin-1-Phosphat für die Proliferation selbst keine Rolle spielen. In den Sphingosinkinase 1-defizienten Tieren war dagegen die Sphingosin-Konzentration in den Zellen erhöht, aber die Sphingosin-1-Phosphat-Konzentration gleich. Darüber hinaus war die Expression der Zellzyklus-Regulatoren CDK4 und c-Myc reduziert, was zu einer verzögerten G₁/S-Phase-Transition führt und dadurch die Proliferation reduziert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivität der Sphingosinkinase 1 eine wesentliche Rolle bei der Tumorentstehung und –Progression hat.

Daher erscheint die Entwicklung spezifischer Inhibitoren der Sphingosinkinase 1 für die Therapie von Krebserkrankungen ein wichtiger Schritt zu sein. Dennoch muss dabei immer in Betracht gezogen werden, dass sich die Rolle der Sphingosinkinase 1 bei der Zellproliferation zwischen Tumor- und Nicht-Tumorzellen erheblich unterscheiden könnte.

In den letzten Jahren konnte von zahlreichen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass exogen appliziertes Sphingosin-1-Phosphat ebenfalls eine proliferative Wirkung ausübt (Harada et al., 2004, Kim et al., 2006). So konnten bereits Olivera und Spiegel (1993) zeigen, dass die exogene Gabe von Sphingosin-1-Phosphat über die Aktivierung der Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren und eine ERK-Aktivierung zur Proliferation der Zellen führt. Kim et al. (2006) konnten zeigen, dass die Proliferation von Chondrocyten abhängig ist von einem Pertussistoxin-sensitiven S1P-Rezeptor und sowohl über die ERK-Kinasen (extracellular signal regulated kinase) als auch über die p38-Kinase vermittelt wird. Pébay et al. konnten bereits 2001 in Astrozyten die Expression von S1P₁- und S1P₃-Rezeptoren nachweisen. Darüber hinaus zeigen die Experimente dieser Gruppe, dass Sphingosin-1-Phosphat unterschiedliche Signalkaskaden in der Zelle aktiviert; dazu zählen die Proteinkinase C und die PI-3-Kinase. Bereits 2000 untersuchten An et al. die Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat auf Hepatomzellen der Ratte (HTC4-Zellen) und wollten klären, ob die beobachteten Effekte auf die Aktivierung von S1P-Rezeptoren zurückzuführen sind oder ob die Proliferation intrazellulär durch Sphingosin-1-Phosphat induziert wird. Dazu verwendeten sie stabil mit den S1P-Rezeptoren S1P₃ und S1P₂ transfizierte HTC4-Zellen. Sie konnten zeigen, dass beide Rezeptoren durch Sphingosin-1-Phosphat aktiviert werden und dies in der Aktivierung von ERK-Kinasen sowie der Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos resultiert, die wiederum für die Induktion der Proliferation eine wichtige Rolle spielen. Interessanterweise konnten van Brocklyn et al. (2002) in humanen Gliomzellen zeigen, dass auch durch Mikroinjektion in das Zytoplasma zugeführtes intrazelluläres Sphingosin-1-Phosphat zu einer gesteigerten Proliferation in diesen Zellen führt.

Auch in Mesangiumzellen wurden bereits erste Untersuchungen bezüglich der Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat durchgeführt. Hanafusa et al. (2002) konnten eine Induktion der Proliferation in den Mesangiumzellen der Ratte nachweisen. Katsuma et al. (2002) untersuchten die den von Hanafusa et al. (2002) beobachteten Effekten, zugrunde liegenden Signalmechanismen und konnten zeigen, dass die Bindung an den entsprechenden S1P-Rezeptor von entscheidender Bedeutung ist ebenso wie auch die Aktivierung der ERK-Kinase. Die Reproduktion dieser Ergebnisse gelang im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht. Gennero et al. (2002) konnten jedoch zeigen, dass unterschiedliche Zelldichten zu unterschiedlichen Zellantworten führen können. So hat Sphingosin-1-Phosphat auf Mesangiumzellen in niedriger Zelldichte (2×10^4 Zellen/cm²) eine apoptotische

Wirkung, während bei hoher Zelldichte die Zellen proliferieren. Die Autoren führen dies auf eine verstärkte Hydrolyse von Sphingosin-1-Phosphat und eine Akkumulation von Sphingosin und Ceramid in den Zellen zurück. Möglicherweise hatten die von uns verwendeten Zellen auch nicht die „richtige“ Zelldichte, um die Proliferation durch Sphingosin-1-Phosphat zu zeigen. In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte RT-PCR-Analysen konnten in den von uns verwendeten Mesangiumzellen die Expression aller fünf S1P-Rezeptoren nachweisen. So kann zumindest ausgeschlossen werden, dass die Zellen aufgrund fehlender Rezeptoren nicht in der Lage waren, auf den Stimulus zu reagieren. Auch die Depletion der Sphingosinkinase 1 durch siRNA hatte keinen Effekt auf die Proliferation der Mesangiumzellen. Worauf die unterschiedlichen Ergebnisse zurückzuführen sind, ist nicht klar. Allerdings war die von Hanafusa et al. (2002) beschriebene Zunahme der Proliferation nicht sehr groß. Möglicherweise verhalten sich die Mesangiumzellen auch unterschiedlich, abhängig von der Zellpassage oder dem Zeitpunkt der Isolation. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Untersuchung von Geoffroy et al. (2005), die sich mit dem Effekt von Diabetes auf die Proliferation von renalen Zellen in Ratten befasst. Im Rahmen der Studie wurde ein Diabetes in den Ratten durch Injektion von Streptozotozin künstlich induziert und die Veränderungen in der Aktivität der neutralen Ceramidase und der Sphingosinkinase 1 untersucht und mit zellulären Prozessen, wie Hyperplasie und Proliferation der Mesangiumzellen, korreliert. Weitere Untersuchungen zeigten darüber hinaus eine erhöhte Konzentration von Sphingosin-1-Phosphat im geschädigten Gewebe. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen auf eine mögliche Involvierung verschiedener Sphingolipidmetabolite zumindest in den frühen Stadien der diabetischen Nephropathie.

4.4 Rolle der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei Krankheitsprozessen

In den letzten Jahren zeigte sich immer mehr, dass die Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels, insbesondere die Sphingosinkinasen, auch eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren haben können. Histologische Untersuchungen in gesundem Lungengewebe und in Tumorgewebe verschiedener Lungentumoren konnten beispielsweise nachweisen, dass die Sphingosinkinase 1 sowohl in gesundem als auch in Krebsgewebe exprimiert wird, die Expression in Tumorgewebe aber deutlich erhöht ist (Johnson et al., 2005). Zusätzlich ist die mRNA-Expression dieses Enzyms ebenfalls deutlich erhöht. Eine solche Erhöhung der mRNA-Expression konnte auch in anderen soliden Tumoren nachgewiesen werden (Kawamori et al., 2006; French et al., 2003).

Neben der Proliferation und der Migration von Tumorzellen spielt auch der zelluläre Prozess der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika eine wichtige Rolle. Solche Resistenzen stellen für die Tumorthherapie ein großes Problem dar. Zahlreiche Untersuchungen bezüglich der Wirkung verschiedener Chemotherapeutika auf die Expression der Sphingosinkinase 1 wurden durchgeführt. So konnte eine Verminderung der Expression beispielsweise mit Doxorubicin und Etoposid in Tumorzellen gezeigt werden (Taha et al., 2004). Die Autoren vermuten anhand dieser Daten eine Korrelation zwischen dem Verlust der Expression der Sphingosinkinase 1 und einer erhöhten Apoptoserate der Tumorzellen durch die Chemotherapie. Eine erste Verbindung zwischen der Aktivität der Sphingosinkinase 1 und den Prozessen, die die Apoptose der Tumorzellen kontrollieren, konnte bereits 2001 durch Cuvillier und Levade in humanen Leukämiezellen aufgezeigt werden. Normalerweise führt die Stimulation von Jurkat-Zellen, HL-60-Zellen und U937-Zellen mit Ceramid, TNF alpha und anti-Fas-Antikörper zu einer erhöhten Apoptoserate. Gleichzeitige Gabe von Sphingosin-1-Phosphat verhindert die Aktivierung der Apoptosekaskade durch Blockierung der Translokation von Cytochrom c und Smac/DIABLO von den Mitochondrien ins Cytosol. Auch die Stimulation der Sphingosinkinase 1 mit TPA verhindert die Freisetzung von Cytochrom c und Smac/DIABLO. Die Verwendung des Sphingosinkinase-Inhibitors *N,N*-Dimethylsphingosin dagegen sensibilisierte die Leukämiezellen für die durch zellpermeables Ceramid, TNF-alpha und anti-Fas induzierbare Apoptose, was deutlich auf eine Funktion der Kinase und ihres Produkt Sphingosin-1-Phosphat für den Schutz der Zellen vor Apoptose hinweist. Bereits seit langem bekannt ist die Fähigkeit von Prostatakrebszellen der durch Chemotherapie induzierten Apoptose zu entkommen. So ist die humane Prostatakrebszelllinie PC3 resistent gegen das Chemotherapeutikum Camptothecin (CPT). Akao et al. (2006) untersuchten die Beteiligung der Sphingosinkinase 1 und verschiedener S1P-Rezeptoren an dieser Resistenz. Sie konnten zum einen zeigen, dass die PC3-Zellen eine erhöhte Expression der Sphingosinkinase 1 und des S1P₁- und S1P₃-Rezeptors im Vergleich zu „normalen“ Prostatazellen aufweisen. Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, dass die Applikation von Camptothecin die Expression aller drei Proteine noch zusätzlich erhöhen kann. Wurde jedoch die Expression der Sphingosinkinase 1 durch die Verwendung von siRNA reduziert oder aber die Signaltransduktion über die S1P-Rezeptoren durch Verwendung von Pertussistoxin blockiert, wurde das Zellwachstum in signifikanter Art reduziert. Die Autoren schlossen daraus, dass sowohl die Sphingosinkinase 1 als auch die S1P-Rezeptoren eine wesentliche Rolle für den Schutz der PC3-Zellen vor Apoptose induziert durch Camptothecin und Docetaxel spielen (Pchejetski et al. 2005, Akao et al., 2006). Ähnliche Ergebnisse wie mit den PC3-Zellen konnten auch in humanen Melanomzellen erhalten werden (Bektas et al., 2005). Einige humane Melanomzelllinien (A-375, M186) können über den Ceramid- und den

Fas-induzierten Signalweg in die Apoptose getrieben werden. Im Gegensatz dazu sind die Zelllinien Mel-2a und M221 resistent. Die Gruppe von Bektas et al. (2005) konnte zeigen, dass die resistenten Zelllinien ein erhöhtes Ceramid/S1P-Verhältnis aufwiesen, das in den sensitiven Zelllinien nicht auftrat. Zudem verlieh die Überexpression der Sphingosinkinase 1 den A-375-Zellen eine verringerte Sensitivität gegenüber der Ceramid- oder Fas-induzierten Apoptose. Im Gegensatz dazu führte die Depletion der Sphingosinkinase 1 in den Mel-2a-Zellen zu einer erhöhten Sensitivität und einer höheren Apoptoserate. Darüber hinaus scheint eine Verbindung zwischen der Expression des überlebensfördernden Proteins Bcl-2 und der Expression und Aktivität der Sphingosinkinase 1 zu bestehen. Überexpression von Bcl-2 in A-375-Zellen erhöhte dort die Expression und Aktivität der Sphingosinkinase 1, während die Verminderung der Expression von Bcl-2 auch die Expression der Sphingosinkinase 1 zu reduzieren vermag. Diese Verbindung mag zu der Resistenz der humanen Melanomzellen *in vivo* wesentlich beitragen. Besonders interessant erscheint die Untersuchung von van Brocklyn et al. (2005) über die Korrelation der Expression der verschiedenen Sphingosinkinase-Isoformen und der Überlebensrate von Patienten mit Glioblastomen. Astrozytomzellen der unterschiedlichen Stadien exprimieren die S1P₁-, S1P₂- und S1P₃-Rezeptoren; das Expressionsmuster selbst hatte aber keinen Einfluss auf die Überlebensrate. Im Gegensatz dazu hatte die Expression der Sphingosinkinase 1, nicht aber der Sphingosinkinase 2, einen deutlichen Einfluss auf die Überlebensdauer der Patienten mit einem Astrozytom im Stadium 4. Je höher die Expression der Sphingosinkinase 1 in den Proben war, desto schlechter war die Prognose. Interessante Untersuchungen zur Rolle der Sphingosinkinasen und anderer Sphingolipidstoffwechsel-Enzyme wurden in *Dictyostelium discoideum* durchgeführt. Dort konnte gezeigt werden, dass die Expression der Sphingosin-1-Phosphat-Lyase einen direkten Einfluss auf die Sensitivität des Schleimpilzes gegenüber Cisplatin und Carboplatin hat. Je höher die Expression dieses Enzymes war, umso höher war die Sensitivität gegenüber den Chemotherapeutika. Der Effekt war nicht zu beobachten bei Stimulation mit Doxorubicin, 5'-Fluorouracil und Etoposid (Molenaar et al., 2000). In *Dictyostelium discoideum* findet man darüber hinaus auch die beiden Homologe für die Sphingosinkinase 1 und 2 (*sgkA*, *sgkB*) in höheren Eukaryoten (Min et al., 2005). Die Deletion beider Gene führte zu einer verminderten Wachstumsrate, während die Überexpression den gegenteiligen Effekt zeigte. Die Nullmutanten zeigten eine deutliche Sensitivität gegenüber Cisplatin (*sgkA*⁻ > *sgkB*⁻ > *sgkA*⁺), während die Überexpression von *sgkA* eine Resistenz vermittelte. Die Sensitivität der Nullmutanten gegenüber Cisplatin konnte durch Applikation von Sphingosin-1-Phosphat deutlich reduziert werden (Min et al., 2004, 2005). Applikation von N,N-Dimethylsphingosin erhöhte die Sensitivität von Wildtyp-Zellen gegenüber Cisplatin (Edsall et al., 1998). Alle diese Daten unterstützen die Hypothese, dass die Sphingosinkinase 1 eine positive Rolle zumindest beim

Tumorstadium und der Vermittlung einer Resistenz gegen bestimmte Chemotherapeutika spielt. Daher erscheint es erstrebenswert, bei der Behandlung von Tumoren eine Verminderung der Expression der Sphingosinkinase 1 zu erreichen, um die Entstehung von Resistenzen zu verhindern und die Apoptoserate der Tumorzellen zu erhöhen. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen an Sphingosinkinase 1-defizienten Mäusen. Kohno et al. (2006) untersuchten die Rolle der Sphingosinkinase 1 bei der Entstehung und Proliferation von Dünndarmkrebs in $Apc^{min/+}$ $Sphk1^{-/-}$ Mäusen. Sie konnten zeigen, dass die Tumorgöße in diesen Tieren reduziert war im Vergleich zu den $Apc^{min/+}$ -Tieren. Außerdem war die Proliferationsrate der einzelnen Polypen in den $Sphk1^{-/-}$ -Mäusen deutlich geringer als in den $Apc^{min/+}$ -Tieren. Darüber hinaus untersuchte die Gruppe auch die Wirkung der S1P-Rezeptoren bei der Entstehung und Progression dieses Tumortyps. Sie konnten in S1P₁-, S1P₂- und S1P₃-Rezeptor-defizienten Mäusen keine Veränderung der Proliferationsrate oder der Tumorgöße zu nachweisen. Die Autoren schlossen daraus, dass die Signaltransduktion durch S1P-Rezeptoren und Veränderungen darin *per se* keinen Einfluss auf die Progression und Entstehung dieses Tumortyps haben, wohl aber die Veränderung in der Expression der Sphingosinkinase 1.

Bereits früh zeigte sich bei verschiedenen Untersuchungen eine Involvierung von Ceramid bei Krebs. Bereits 1996 konnten Wiesner und Dawson zeigen, dass Ceramid eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose in neuronalen Tumorzellen hat. Bereits ein Jahr später konnten Chmura et al. (1997) zeigen, dass der Verlust der neutralen Sphingomyelinase in der lymphoiden Tumorzelllinie WEHI-231 und damit einhergehend die fehlende Ceramidsynthese diesen Zellen eine Resistenz gegenüber der durch Bestrahlung induzierbaren Apoptose verleiht. Selzner et al. (2001) wiederum konnten für humanen Dickdarmkrebs zeigen, dass die Gabe von Ceramidanalogen die Apoptose in diesen Zellen induzieren kann und ebenso das Zellwachstum beschränkt. Ebenso konnte durch die Verwendung von Ceramidase-Inhibitoren in den Tumorzellen, jedoch nicht in den Wildtypzellen, die Apoptose über die Aktivierung von Caspasen und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien stark induziert werden. Die Autoren führen diesen Effekt auf die Akkumulation von Ceramid in den Tumorzellen zurück. Eto et al. (2006) konnten zeigen, dass für die Induktion der Apoptose in Prostatakrebszellen die Akkumulation von C16-Ceramid von entscheidender Bedeutung ist. Zudem konnten Morales et al. (2007) nachweisen, dass die pharmakologische Blockierung der sauren Ceramidase oder aber die Depletion dieses Enzyms durch siRNA Leberkrebszellen für die Chemotherapie sensibilisieren kann und *in vivo* das Tumorstadium reduzieren kann. Dies weist direkt auf die Bedeutung der unterschiedlichen Ceramidasen und von Ceramid bei der Tumorstadium hin und lässt diese Enzyme von besonderem Interesse für die Therapie verschiedener Krebserkrankungen erscheinen.

Neben einer wichtigen Rolle bei der Tumorentstehung wurde auch eine wichtige Rolle der Sphingosinkinase 1 bei entzündlichen Erkrankungen und Diabetes vorgeschlagen. Lee et al. (2004) konnten *in vivo* im Mausmodell zeigen, dass die Inhibierung der Sphingosinkinase 1 die Schockreaktion nach einer Lungenverletzung abmildern kann. Weiterhin wurde berichtet, dass Sphingosin-1-Phosphat zahlreiche pro-entzündliche Effekte in Immunzellen hat. Dazu zählen unter anderem die Mobilisierung von Mastzellen- und Monocyten (Choi et al., 1996, Melendez et al., 1998, Melendez et al., 2002, Jolly et al., 2004) und die Induzierung der Chemotaxis von Eosinophilen (Roviezzo et al., 2004). MacKinnon et al. (2002) konnten nachweisen, dass die Sphingosinkinase 1 eine wesentliche Rolle beim Priming der Neutrophilen spielt und somit für den Schutz vor Infektionen von wesentlicher Bedeutung sein könnte. Darüber hinaus kann die Manipulation der Aktivität der Sphingosinkinase 1 durch intrazelluläre Pathogene, wie z.B. durch *Mycobacterium tuberculosis*, deren Überlebensfähigkeit in Makrophagen verbessern (Russel et al., 2001; Malik et al., 2003). Normalerweise wird *Mycobacterium tuberculosis* von Makrophagen internalisiert. Andere Bakterien werden nun durch Reifung des Phagosoms abgetötet und abgebaut. *Mycobacterium tuberculosis* verhindert jedoch die Reifung des Phagosoms und blockiert damit die Bildung eines sauren, lysosomalen Kompartiments. Die Reifung des Phagosoms selbst ist dabei abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. *Mycobacterium tuberculosis* verhindert die Reifung in humanen Makrophagen durch Inhibierung der Sphingosinkinase 1 (Malik et al., 2003). Auch in Mastzellen, die nach ihrer Aktivierung vor allem bei allergischen Reaktionen große Mengen von bioaktiven Mediatoren und Zytokinen ausschütten, wurde nach einer Zellaktivierung durch FcεRI eine erhöhte Aktivität der Sphingosinkinase 1 gezeigt, die für die nachfolgende Synthese und Freisetzung von TNF-alpha und IL-5 verantwortlich gemacht wird (Prieschl et al., 1999). Für Lymphocyten konnte gezeigt werden, dass Sphingosin-1-Phosphat zu einem Festhalten der Zellen in sekundären Lymphorganen führt und die Zellen damit von Orten der Entzündung ferngehalten werden können (Rosenfeldt et al., 2001) ähnlich, wie es auch für FTY720, einem Analog von Sphingosin-1-Phosphat, nachgewiesen werden konnte (Zemann et al., 2006).

Einige Untersuchungen befassten sich zudem mit der Identifikation von Genen, die eine wichtige Rolle bei bestimmten Erbkrankheiten spielen. Hünermund et al. (2004) fanden in diesem Zusammenhang als möglichen Kandidaten für eine Rolle bei der vererbten neuralgischen Amyotrophie (HNA) neben TIMP 2 („tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase 2“) und Cytoglobin auch die Sphingosinkinase 1. Bei dieser Erbkrankheit handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte fokale Neuropathie, die gekennzeichnet ist durch schwere Schmerzen, Schwäche und Atrophie im Schultergürtel und in den oberen Extremitäten. Die Krankheit verläuft in Schüben, wobei die einzelnen Schübe durch grippeähnliche Symptome begleitet werden und damit eine Beteiligung des Immunsystems implizieren. Zudem ist das

Gen der Sphingosinkinase 1 der Ratte ist auf Chromosom 10 in einer telomeren Region lokalisiert, die mit entzündlichen Krankheiten wie rheumatoider Arthritis assoziiert zu sein scheint (Remmers et al., 1996). Ähnliches gilt für die humane Sphingosinkinase 1. Diese ist lokalisiert auf 17q25 (Melendez et al., 2000), einem Locus, dem Gene für die Induzierung unterschiedlicher entzündlicher Erkrankungen, wie Sklerose, Psoriasis und Epidermodisplasie, zugeordnet zu sein scheinen (Becker et al., 1998; Kuokkanen et al., 1997, Nair et al., 1997, Ramoz et al., 1999, Tomfohrde et al., 1994).

Auch für die diabetische Nephropathie konnte zumindest im Rattenmodell eine mögliche Funktion der Sphingosinkinase 1 aufgezeigt werden. Zur Induktion des Diabetes wurden die Versuchstiere mit Streptozotocin behandelt, welches einen kurzzeitigen Diabetes auslöst und zu einer erhöhten intraglomerulären Hyperplasie führt. Parallel zur Hyperplasie konnte auch eine erhöhte Aktivität der neutralen Ceramidase und der Sphingosinkinase 1 gezeigt werden (Geoffroy et al. 2004, 2005). Daneben konnte die Gruppe erhöhte Konzentrationen von Sphingosin-1-Phosphat in den Zellen des Nierenkortex nachweisen. Die Autoren schlossen daraus, dass die Sphingosinkinase 1 und Sphingosin-1-Phosphat eine wichtige Rolle bei der proliferativen Antwort des Glomerulus in den frühen Stadien der diabetischen Nephropathie spielen könnten.

Auch bei der Angiogenese und Neovaskularisation von Geweben scheint die Sphingosinkinase 1 und Sphingosin-1-Phosphat von entscheidender Bedeutung zu sein. So untersuchten Mizugishi et al. (2005) die Funktion der Sphingosinkinase 1 und 2 während der Embryogenese. Die Gruppe konnte zeigen, dass Sphingosinkinase 1-defiziente Mäuse, ebenso wie Sphingosinkinase 2-defiziente Mäuse lebensfähig und fortpflanzungsfähig waren. Homozygote Sphingosinkinase 1/2-defiziente Mäuse waren dagegen nicht lebensfähig und starben zwischen E9.5 und E11.5. Bis zum Zeitpunkt E9.5 erscheinen die Embryonen in den homozygoten Doppelmutanten noch normal im Vergleich zu den „normalen“ Wildtypembryonen. Ab E11.5 zeigten die Embryonen jedoch starke Blutungen im Schädelbereich, im Rückenmark und anderen mesenchymalen Körperbereichen. Darüber hinaus zeigten sich Missbildungen der Blutgefäße vor allem im Bereich der dorsalen Aorta und in den Hirngefäßen, sowie eine Exencephalie, möglicherweise ausgelöst durch eine erhöhte Apoptoserate im Neuroepithel aufgrund des fehlenden Sphingosin-1-Phosphats. Keiner der Embryonen war über E13.5 hinaus lebensfähig. Diese Missbildungen vor allem im Blutgefäßsystem erinnern stark an den Phänotyp, der in S1P₁-rezeptordefizienten Mäusen beobachtet werden kann. Homozygote S1P₁-rezeptordefiziente Mäuse sterben zwischen E12.5 und E14.5 aufgrund von inneren Blutungen, die durch die unvollständige Reifung der Gefäße hervorgerufen werden. Im Gegensatz dazu findet man keinen letalen Phänotyp in S1P₂- und S1P₃-rezeptordefizienten Mäusen (Kono et al., 2004). Die gleiche Gruppe

untersuchte auch die Wirkung von Doppel- und Dreifachmutationen in den S1P₁-, S1P₂- und S1P₃-Rezeptorgenen. Sie konnten zeigen, dass die Doppelmutation (S1P₁^{-/-} / S1P₂^{-/-}) und die Dreifachmutation (S1P₁^{-/-} / S1P₂^{-/-} / S1P₃^{-/-}) einen Phänotyp hervorruft, der noch wesentlich schwerwiegender war als der durch Deletion des S1P₁-Rezeptors hervorgerufene. Gemeinsam waren allen Deletionsmutationen ausgeprägte Blutungen im gesamten Embryo, hervorgerufen durch eine unvollständige Reifung der Gefäße. Ebenso zeigten die Doppel- und Dreifachmutationen Fehler bei der Extremitätenbildung. Alle Embryonen starben zwischen E10.5 und E14.5. Dies deutet darauf hin, dass die Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren, ebenso wie die Sphingosinkinasen eine wichtige Rolle auch in der Embryogenese und vor allem bei der Gefäßbildung und -reifung innehaben.

In Anbetracht all dieser Daten und Publikationen kann zusammenfassend vermutet werden, dass die Aktivierung der Sphingosinkinase 1 in den Mesangiumzellen durch extrazelluläre Nukleotide möglicherweise im Rahmen von entzündlichen Prozessen, wie es die verschiedenen Formen der Glomerulonephritis darstellen, den Zellen die Möglichkeit zur Verfügung stellt, auf die neuen Bedingungen zu reagieren und durch vermehrte Migration der noch vorhandenen Mesangiumzellen zu den betroffenen Glomeruluspartien eine Resolution der Entzündung zu ermöglichen. Da das Produkt der Sphingosinkinase 1 darüber hinaus auch einen Einfluss auf die bei entzündlichen Prozessen involvierten Immunzellen hat, könnte die Sphingosinkinase 1 auch als interessanter neuer Angriffspunkt dienen, um zahlreiche entzündliche Erkrankungen zu behandeln. Weitere Untersuchungen zur Expression und Regulation dieses Enzyms in verschiedenen Mausmodellen, wie z.B. der Thy-1-Glomerulonephritis und der durch Streptozotozin induzierbaren diabetischen Nephropathie, sowie die detaillierte Charakterisierung der vorhandenen Sphingosinkinase 1- oder 2- defizienten Mauslinien werden Zukunft zu einem besseren Verständnis sowohl der Funktion der Sphingosinkinase 1 in diesem Zelltyp als auch im Rahmen des Erkrankungsgeschehens beitragen.

Ebenfalls schon seit langem bekannt ist die Rolle der sauren Ceramidase bei lysosomalen Speicherkrankheiten. Prinzipiell katalysiert die saure Ceramidase den letzten Schritt beim Abbau von Glycosphingolipiden in den Lysosomen der Zelle (Bernado et al., 1995, Sandhoff und Kolter, 1997). Eine auf Mutationen in diesem Gen zurückzuführende Erkrankung stellt die Farbersche Lipogranulomatose dar. Dabei kommt es zu einer Akkumulation von nicht abgebautem Ceramid in den Lysosomen aller Zellen, was sich unter anderem in Schwellungen der Gelenke äußert. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und zeigt sich bereits in den ersten Monaten nach der Geburt. In der Literatur sind sieben Subtypen dieser Erkrankung beschrieben, von denen sechs auf Mutationen im Gen der sauren Ceramidase zurückzuführen sind (Koch et al., 1996, Zhang et al., 2000). Der siebte

Typ ist auf eine Mutation des Sphingolipid-Aktivatorproteins (SAP) zurückzuführen und beeinflusst nicht nur den Ceramidabbau, sondern auch die Degradation anderer Glycosphingolipide. Bereits 1972 konnte Sugita zeigen, dass bei Patienten, die an der Farberschen Lipogranulomatose litten, keine Aktivität der sauren Ceramidase mehr zu detektieren war. 1982 zeigten Momoi et al. dass nur die Aktivität der sauren Ceramidase in der Farberschen Lipogranulomatose fehlte, nicht jedoch die der alkalischen Ceramidase. Interessanterweise konnten Huang et al. (2004) in Alzheimer-Patienten im Gehirn eine erhöhte Aktivität und Expression der sauren Ceramidase nachweisen. Immunhistochemische Färbungen zeigten die Akkumulation dieses Enzyms hauptsächlich in den Zellkörpern der Neuronen. Die Autoren erklären sich diese Entdeckung mit einer möglichen Rolle der sauren Ceramidase bei der Kontrolle der Apoptose von Neuronen und vermuten, dass durch die saure Ceramidase vermittelte Signalwege möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Alzheimer spielen könnten. In eine ähnliche Richtung weisen auch die Untersuchungen von Avramopoulos et al. (2007). Die Gruppe identifizierte ein durch Genduplikation im Menschen entstandenes Paralog des Gens der alkalischen Ceramidase. Die Expression dieses Gens (ASAH2L) scheint mit zunehmendem Lebensalter abzunehmen. Gleichzeitig zeigen Frauen eine generell niedrigere Expression. Die Autoren vermuten, dass es sich bei der niedrigen Expression dieses Genes um einen möglichen Risikofaktor für die Entstehung der „late onset“-Alzheimerschen Erkrankung handelt. Dies lässt sowohl die saure als auch die alkalische (= neutrale) Ceramidase als mögliches Ziel für die pharmakologische Intervention z.B. im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung erscheinen. Weitere Untersuchungen in diese Richtung werden weitere Einsichten bringen.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Sphingosinkinase 1, ebenso wie ihr Ortholog Sphingosinkinase 2 und die neutrale Ceramidase, eine wichtige Rolle innerhalb des regulatorischen Netzwerks der Zelle einnehmen. Durch die Kontrolle des Ceramid/Sphingosin-1-Phosphat-Rheostats gehören diese Enzyme zu den wichtigsten Zielen zukünftiger pharmakologischer Interventionen zur Kontrolle zahlreicher Erkrankungen, wie z.B. Krebs, entzündlichen Nierenerkrankungen und Erkrankungen des Blutgefäßsystems.

4.5. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte die funktionelle Bedeutung der Sphingosinkinase 1 für die durch extrazelluläre Nukleotide induzierbare Migration nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym für die durch ATP und UTP induzierbare Proliferation keine Rolle zu spielen scheint. Da auch gezeigt werden konnte, dass die Expression und Aktivität der Sphingosinkinase 1 durch die Nukleotide modifiziert werden kann und dies zumindest auch auf die Aktivität der Sphingosinkinase 2 und der neutralen Ceramidase in unserem Zellkultursystem zutrifft, wäre es sicherlich interessant zu untersuchen, ob die Veränderungen in den Aktivitäten dieser beiden Enzyme ebenfalls auf Modulationen des Expressionsmusters zurückzuführen sind. Ebenso interessant wäre eine nähere Untersuchung der dieser Erhöhung der Aktivitäten zugrunde liegenden Signalketten.

Bezüglich der Rolle der neutralen Ceramidase und der Sphingosinkinase 2 bei der Regulation der durch Nukleotide induzierbaren Migration und Proliferation müssen sicherlich noch weitergehende Experimente durchgeführt werden. Interessant in diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung der Migrations- und Proliferationsfähigkeit von mSPHK2^{-/-} defizienten Mausmesangiumzellen nach Stimulation mit den aktivierenden Nukleotiden. Geklärt werden könnte in diesem Falle auch die Frage, ob es sich bei der Sphingosinkinase 2 um einen negativen Regulator der Proliferation handeln könnte, wie die Ergebnisse unsererer siRNA-Experimente diesbezüglich zumindest nahelegen.

5.1 Zusammenfassung

In den letzten Jahren gewann die Erforschung des Sphingolipidstoffwechsels in den verschiedensten Zellsystemen immer mehr an Bedeutung, da es sich zeigte, dass einige Sphingolipidspezies, vor allem Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat, als wichtige intra- und extrazelluläre Botenstoffe wirken und bei einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Antworten, wie Apoptose, Proliferation und Migration, eine wichtige Rolle spielen. Während Ceramid eher proapoptotisch und wachstumshemmend wirkt, begünstigt Sphingosin-1-Phosphat als „Gegenspieler“ eher die Proliferation und das Zellwachstum. Ceramid kann relativ schnell in Sphingosin-1-Phosphat umgewandelt werden durch die Wirkung zweier Enzymklassen, den Ceramidasen und den Sphingosinkinasen. Konsequenterweise ist die Regulation dieser Enzyme von entscheidender Bedeutung für das zelluläre Gleichgewicht zwischen Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Wirkung von extrazellulären Nukleotiden, die ebenfalls als Regulatoren zahlreicher zellulärer Antworten, wie z.B. Proliferation und Migration, bekannt sind und über entsprechende Oberflächenrezeptoren, die Purinrezeptoren, wirken, auf die Aktivität besonders der Sphingosinkinasen 1 und 2 näher untersucht. Es sollte geklärt werden, ob die Sphingosinkinasen an einigen durch extrazelluläre Nukleotide induzierbaren zellulären Antworten, in diesem Falle der Migration und der Proliferation von Zellen, beteiligt sind. Als Zellsystem wurden Nierenmesangiumzellen verwendet, da diese Zellen bei verschiedenen entzündlichen Nierenerkrankungen (Glomerulonephritiden) eine wichtige Rolle spielen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass extrazelluläre Nukleotide die Aktivität der Sphingosinkinase 1 in den Mesangiumzellen stimulieren können. Zu beobachten ist dabei eine biphasische Aktivitätssteigerung der Sphingosinkinase 1. Die erste Aktivitätssteigerung nach einer Kurzzeitstimulation ist dabei auf eine Phosphorylierung des Enzyms zurückzuführen, während die zweite Aktivitätssteigerung mit einer Aktivierung des Sphingosinkinase 1-Promotors, einer verstärkten mRNA-Expression und einer *de novo* Proteinsynthese zu erklären ist. Diese Induktion kann durch die Verwendung von Hemmstoffen des PKC- und MAPK-Signalweges, sowie durch Verwendung eines Transkriptions- (Actinomycin D) oder eines Translationsinhibitors (Cycloheximid) blockiert werden. Die Halbwertszeit der mRNA der Sphingosinkinase 1 in den Mesangiumzellen konnte auf ca. 20 Minuten bestimmt werden. Im Gegensatz dazu ist die Sphingosinkinase 2 nicht durch ATP aktivierbar, wohl aber durch diverse Abbauprodukte von ATP, wie AMP und Adenosin, sowie durch UTP und seine Abbauprodukten UDP und UMP. Die neutrale

Ceramidase kann nicht durch ATP und UTP aktiviert werden, wohl aber durch P2X₇-Rezeptoragonisten (Bz-ATP, $\alpha\beta$ -Me-ATP, γ S-ATP) und TPA.

In einem zweiten Schritt wurde die Rolle der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase bei der durch extrazelluläre Nukleotide induzierten Migration und Proliferation untersucht. Es zeigte sich mit Hilfe von genspezifischer siRNA zur Depletion der Sphingosinkinasen und der neutralen Ceramidase, sowie durch Verwendung von Kinase-Hemmstoffen und damit einhergehend der Inhibierung der Signalwege und mit Hilfe von verschiedenen Zelllinien isoliert aus Wildtyp-, SPHK 1-überexprimierenden und mSPHK1-defizienten Mäusen, dass die Aktivierung der Sphingosinkinase 1 durch extrazelluläre Nukleotide von entscheidender Bedeutung für die Migrationsfähigkeit der Zellen ist, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate der Mesangiumzellen hat. Auch die Aktivität der neutralen Ceramidase ist von entscheidender Bedeutung für die Migrationsfähigkeit der Zellen. Durch Depletion der neutralen Ceramidase scheint Ceramid in den Zellen zu akkumulieren, was die Proliferationsrate reduziert. Für die Proliferation der Mesangiumzellen könnte die Sphingosinkinase 2 als negativer Regulator fungieren, wie die Experimente mit der genspezifischen siRNA unter UTP-Stimulation gezeigt haben. Für die Migration der Mesangiumzellen gilt darüber hinaus, dass auch das Produkt der Sphingosinkinase 1, Sphingosin-1-Phosphat, in der Lage ist, die Migration zu stimulieren. Im Gegensatz dazu spielt Sphingosin-1-Phosphat für die Induktion der Proliferation der hier verwendeten Zellen keine wesentliche Rolle.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Sphingosinkinase 1 und vorgeschaltet auch die neutrale Ceramidase bei der Migration von Mesangiumzellen eine zentrale Rolle spielen und damit als therapeutische Angriffspunkte bei der Behandlung von Krankheiten, die durch eine vermehrte Migration gekennzeichnet sind, in Frage kommen.

5.2 Summary

During the last years sphingolipids gained a lot of interest in many different cellular systems because it became more and more obvious that some sphingolipids, especially ceramide and sphingosine-1-phosphate, act as intracellular second messengers and play an important role in a variety of cellular responses, like apoptosis, proliferation and migration. Whereas ceramide acts in a pro-apoptotic fashion as an inhibitor of proliferation, sphingosine-1-phosphate as its counterpart induces proliferation and cell growth. Ceramide itself can easily be converted by ceramidases and sphingosine kinases into sphingosine-1-phosphate. Consequently, the regulation of these enzyme classes is of greatest importance for the cellular balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate ("rheostat model").

This thesis mainly focusses on the effect of extracellular nucleotides, which are also known to be regulators for diverse cellular responses like proliferation and migration by acting on a special subset of membrane receptors (purinoceptors), on the activity especially of sphingosine kinase 1 and 2. We wanted to investigate, if sphingosine kinases are involved in the regulation of some cellular responses induced via application of extracellular nucleotides (migration and proliferation). The cellular system used in this investigation are renal mesangial cells which are known to play a crucial role in several kidney diseases, especially in glomerulonephritis.

We could show that extracellular nucleotides induce the activity of sphingosine kinase 1 in our cellular system. This activation occurs in a biphasic manner. The first peak of activity occurs within minutes after stimulation and is caused by a phosphorylation of sphingosine kinase 1. The second, more delayed peak of activation is due to the activation of the sphingosine kinase 1 promoter and enhanced mRNA synthesis followed by *de novo* protein synthesis. This induction can be blocked by the use of inhibitors of the PKC- and MAPK signaling cascades as well as by using transcriptional (actinomycin D) or translational inhibitors (cycloheximide). The half-life of sphingosine kinase 1 mRNA was determined to be around 20 minutes. In contrast to that, sphingosine kinase 2 can not be induced by ATP but by diverse breakdown products of ATP, like AMP and adenosine, as well as with UTP, UDP and UMP. The neutral ceramidase can be activated by several P2X₇ receptor agonists (Bz-ATP, $\alpha\beta$ -Me-ATP, γ S-ATP) and TPA.

In a second step the role of the sphingosine kinases and the neutral ceramidase in the regulation of migration and proliferation induced by extracellular nucleotides was investigated. We could show by using inhibitors of several signaling pathways as well as by using genspecific siRNA to deplete the enzymes or different genetically modified cell lines (wt, sphingosine kinase 1 overexpressing, mSPHK 1^{-/-}) that the activation of sphingosine

kinase 1 is crucial for the induction of migration by extracellular nucleotides, but not for the proliferation. Depletion of the neutral ceramidase also leads to a reduced migration and proliferation of the cells, probably because of the accumulation of ceramide inside the cells. Sphingosine kinase 2 seems to be a negative regulator in UTP induced migration. Also the product of sphingosine kinase 1, sphingosine-1-phosphate, is able to induce migration in renal mesangial cells.

Taken together, our data show that sphingosine kinase 1 and neutral ceramidase play a pivotal role in the migratory response of renal mesangial cells and therefore might be important therapeutical targets for the treatment of diseases which are characterized by an enhanced migration of this type of cells.

6. Literaturverzeichnis

Abbracchio, MP, Burnstock, G, Boeynaems, JM, Barnard, EA, Boyer, JL, Kennedy, C, Knight, GE, Fumagalli, M, Gachet, C, Jacobson, KA, Weisman, GA. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev*, **58** (3): 281-341.

Abbracchio, MP and Burnstock, G (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y receptors? *Pharmacol Ther*, **64** (3):445-475.

Abraham, EH, Prat, AG, Gerweck, L, Seneveratne, T, Arceci, RJ, Kramer, R, Guidotti, G, and Cantiello, HF (1993). The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90** (1):312-316.

Agresti, C, Meomartini, ME, Amadio, S, Ambrosini, E, Volonte, C, and Aloisi, F (2005). ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. *Brain Res Rev*, **48** (2):157-165.

Ahmad, S, Ahmad, A, McConville, G, Schneider, BK, Allen, CB, Manzer, R, Mason, RJ, and White, CW (2005). Lung epithelial cells release ATP during ozone exposure: signaling for cell survival. *Free Radic Biol Med*, **39** (2): 213-226.

Akao, Y, Banno, Y, Nakagawa, Y, Hasegawa, N, Kim, TJ; Murate, T, Igarashi, Y, and Nozawa, Y (2006). High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **342** (4):1284-1290.

Alesse, E, Zazzeroni, F, Angelucci, A, Giannini, G, Di Marcotullio, L, and Gulino, A (1998). The growth arrest and downregulation of c-myc transcription induced by ceramide are related events dependent on p21 induction, Rb underphosphorylation and E2F sequestering. *Cell Death Differ*, **5** (5):381-389.

Altschul, SF, Gish, W, Miller, EW, and Lipman, DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**: 403-414.

Altschul, SF, Madden, TL, Schäffer, AA, Zhang, Z, Miller, W, and Lipman, DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res*, **25**: 3389-3402.

An, S, Zheng, Y, and Bleu, T (2000). Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J Biol Chem*, **275** (1): 288-296.

Ancellin, N, Colmont, C, Su, J, Li, Q, Mittereder, N, Chae, SS, Stefanson, S, Liau, G, and Hla, T (2002). Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine-1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J. Biol Chem*, **277** (8): 6667-6675.

Anliker, B, and Chun, J (2004). Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol*, **15** (5):457-465.

Arnold, RS, and Newton, AC (1991). Inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase by sphingosine. *Biochemistry*, **30** (31):7747-7754.

Augé, N, Escargueil-Blanc, I, Lajoie-Mazenc, I, Suc, I, Andrieu-Abadie, N, Pieraggi, MT, Chatelut, M, Thiers, JC, Jaffrezou, JP, Laurent, G, Levade, T, Negre-Salvayre, A, and Salvayre, R (1998). Potential role for ceramide in mitogen-activated protein kinase activation and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, **273** (21):12893-12900.

Avramopoulos, D, Wang, R, Valle, D, Fallin, MD, and Bassett, S (2007). A novel gene derived from segmental duplications shows perturbed expression in Alzheimer's disease. *Neurogen* **8** (2): 111-120.

- Bailey, MA, Hillman, KA, and Unwin, RJ. (2000). P2 receptors in the kidney. *J Auton Nerv Syst*, **81** (1-3): 264-270.
- Ballou, LR, Lauderkind, SJ, Rosloniec, EF, and Raghov, R (1996). Ceramide signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta*, **1301** (3): 273-287.
- Balthasar, S, Samulin, J, Ahlgren, H, Bergelin, N, Lundqvist, M, Toescu, EC, Eggo, MC, and Tornquist, K (2006). Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile and regulation of migration in human thyroid cancer cells. *Biochem J*, **398** (3): 547-556.
- Bassi, R; Anelli, V, Giussani, P, Tettamanti, G, Viani, P, and Riboni, L (2006). Sphingosine-1-phosphate is released by cerebellar astrocytes in response to bFGF and induces astrocyte proliferation through Gi-protein-coupled receptors. *Glia*, **53** (6): 621-630.
- Baumruker, T, Pendl, GG, and Prieschl, EE (1997). Gene regulation after Fc epsilon RI stimulation in the murine mast cell line C11. *Int Arch Allergy Immunol*, **113** (1-3): 39-41.
- Baumruker, R, Csonga, R, Jaksche, D, Novotny, V, and Prieschl, EE (1999). TNF-alpha and IL-5 gene induction in IgE plus antigen-stimulated mast cells require common and distinct signaling pathways. *Int Arch Allergy Immunol*, **118** (2-4): 108-111.
- Bean, BP (1992). Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci*, **13** (3): 87-90.
- Becciolini, L, Meacci, E, Donati, C, Cencetti, F, Rapizzi, E, and Bruni, P (2006). Sphingosine 1-phosphate inhibits cell migration in C2C12 myoblasts. *Biochim Biophys Acta*, **1761** (1): 43-51.
- Becker, KG, Simon, RM, Bailey-Wilson, JE, Freidlin, B, Biddison, WE, McFarland, HF, and Trent, JM. (1998). Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Nat. Acad Sci USA*, **95** (17): 9979-9984.
- Bektas, M, Jolly, PS, Müller C, Eberle, J, Spiegel, S, and Geilen, CC (2005). Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene*, **24** (1):178-187.
- Bernardo, K, Hurwitz, R, Zenk, T, Desnick, RJ, Ferlinz, K, Schuchman, EH, Sandhoff, K (1995). Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *J Biol Chem* **270** (19): 11098-11102.
- Berridge, MJ, and Irvine, RF (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312** (5992): 315-321.
- Berridge, MJ. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* **56** : 159-193.
- Birnboim, HC, and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7** (6): 1513-1523.
- Boarder, MR, and Hourani, SM (1998). The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **19** (3): 99-107.
- Bogdanov, YD, Wildman, SS, Clements, MP, King, BF and Burnstock, G (1998). Molecular cloning and characterisation of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br J Pharmacol*, **124** (3): 428-430.
- Boguslawski, G, Lyons, D, Harvey, KA, Kovala, AT, and English, D (2000). Sphingosylphosphorylcholine induces endothelial cell migration and morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **272** (2): 603-609.
- Bowden, A, Patel, V, Brown, C, and Boarder, MR (1995). Evidence for requirement of tyrosine phosphorylation in endothelial P2Y- and P2U-purinoceptor stimulation of prostacyclin release. *Br J Pharmacol*, **116** (6): 2563-2568.

- Boyer, JL, Lazarowski, ER, Chen, X-H, and Harden, TK (1993). Identification of a P2Y-purinergic receptor that inhibits adenylyl cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*, **267** (3):1140–1146.
- Boyer, JL, O'Tuel, JW, Fischer, B, Jacobson, KA, and Harden, TK (1995). Potent agonist action of 2-thioether derivatives of adenine nucleotides at adenylyl cyclase-linked P2Y-purinoceptors. *Br J Pharmacol*, **116** (6): 2611–2616.
- Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem*, **72** : 248-254.
- Brand, T (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol*, **258** (1): 1-19.
- Brake, AJ, Wagenbach, MJ, and Julius D (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, **371** (6497): 519–523.
- Brändle, U, Spielmanns, P, Osteroth, R, Sim, J, Surprenant, A, Buell, G, Ruppertsberg, JP, Plinkert, PK, Zenner, H-P, and Glowatzki E (1997). Desensitization of the P2X2 receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett*, **404** (2-3): 294–298.
- Braunstein, GM, Roman, RM, Clancy, JP, Kudlow, BA, Taylor, AL, Shylonsky, VG, Jovov, B, Peter, K, Jilling, T, Ismailov, II; Benos, DJ, Schwiebert, LM; Fitz, JG, and Schwiebert, EM (2001). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem*, **276** (9): 6621-6630.
- Buehrer, BM, Bardes, ES, and Bell, RM (1996). Protein kinase C-dependent regulation of human erythroleukemia (HEL) cell sphingosine kinase activity. *Biochim Biophys Acta*, **1303** (3): 233–242.
- Burnstock, G, and Kennedy, C (1986). Purinergic receptors in the cardiovascular system. *Prog Pharmacol*, **6** :111–132.
- Burnstock, G, and Wood, JN (1996). Purinergic receptors: Their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol*, **6** (4): 526–532.
- Burnstock, G (1990). The fifth Heymans memorial lecture-Ghent, February 17, 1990: Co-transmission. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **304** : 7–33.
- Burnstock, G (1997). The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*, **36**: 1127-1139.
- Burow, ME, Weldon, CB, Collins-Burow, BM, Ramsey, N, McKee, A, Klippel, A, MacLachlan, CA, Clejan, S, and Beckman, BS (2000). Cross-talk between phosphatidylinositol 3-kinase and sphingomyelinase pathways as a mechanism for cell survival/death decisions. *J Biol Chem*, **275** (13): 9628-9635.
- Buxton, IL, Kaiser, RA; Oxhorn, BC, and Cheek, DJ (2001). Evidence supporting the Nucleotide Axis Hypothesis: ATP release and metabolism by coronary endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281** (4):H1657-H1666.
- Campbell, NA (1998). Biologie. 1. korrigierter Nachdruck. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Chang, K, Hanaoka, K, Kumada, M, and Takuwa, Y (1995). Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem (Tokyo)*, **270** (44): 26152–26158.
- Chaulet, H, Desgranges, C, Renault, M-A, Dupuch, F, Ezan, G, Peiretti, F, Loirand, G, Pacaud, P, and Gadeau, A-P (2001). Extracellular nucleotides induce arterial smooth muscle cell migration via osteopontin. *Circ. Res*, **89** (9): 772-778.
- Chen, C-C, Akopian, AN, Sivilotti, L, Colquhoun, D, Burnstock, G, and Wood, JN (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, **377** (6548): 428–431.

- Chen, ZP, Krull, N, Xu, S, Levy, A, and Lightman SL (1996b). Molecular cloning and functional characterization of a rat pituitary G protein-coupled ATP receptor. *Endocrinology*, **137** (5): 1833–1840.
- Chessell, LP, Michel, AD, and Humphrey, PPA (1997). Functional evidence for multiple purinoceptor subtypes in the rat medial vestibular nucleus. *Neuroscience*, **77** (3): 783–791.
- Chinellato, A, Ragazzi, E, Pandolfo, L, Froidi, G, Caparrotta, L, and Fassina, G (1994). Purine- and nucleotide-mediated relaxation of rabbit thoracic aorta: Common and different sites of action. *J Pharm Pharmacol*, **46** (5): 337–341.
- Chmura, SJ, Nodzenski, E, Beckett, MA, Kufe, DW, Quintans, J, and Weichselbaum, RR (1997). Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res*, **57** (4): 1270–1275.
- Choi, S-Y, and Kim, K-T (1996). Characterization of Na⁺ influx mediated by ATP(4-)-activated P2 purinoceptors in PC12 cells. *Br J Pharmacol*, **118** (4): 935–940.
- Chomczynski, P and Sacchi, N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162** (1): 156–159.
- Churchill, PC, and Churchill, MC (1985). A1 and A2 adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther*, **232** (3): 589–594.
- Cinque, B, di Marzio, L, Centi, C, di Rocco, C, Riccardi, C, and Grazia Cifone, M (2003). Sphingolipids and the immune system. *Pharmacol Res*, **47** (5): 421–437.
- Coco, S, Calegari, F, Pravettoni, E, Pozzi, D, Taverna, E, Rosa, P, Matteoli, M, and Verderio, C (2003). Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem*, **278** (2):1354–1362.
- Collo, G, North, RA, Kawashima, E, Merlo-Pich, E, Neidhart, S, Surprenant, A, and Buell, G (1996). Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci*, **16** (8): 2495–2507.
- Communi, D, Motte, S, Boeynaems, J-M, and Piroton S (1996). Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol*, **317** (2-3): 383–389.
- Communi, D, Parmentier, M, and Boeynaems, J-M (1996). Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **222** (2): 303–308.
- Communi, D, Piroton, S, Parmentier, M, and Boeynaems, J-M (1996). Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J Biol Chem*, **270** (52): 30849–30852.
- Communi, D, Govaerts, C, Parmentier, M, and Boeynaems, JM (1997). Cloning of human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, **272**: 31969–31973.
- Coroneos, E, Martinez, M, McKenna, S and Kester, M. (1995). Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation. *J. Biol Chem*, **270** (40): 23305–23309.
- Coroneos, E, Wang, Y, Panuska, JR, Templeton, DJ, and Kester, M (1996). Sphingolipid metabolites differentially regulate extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase cascades. *Biochem J*, **316** (Pt 1): 13–17.
- Coursol, S, Fan, LM, le Stunff, H, Spiegel, S, Gilroy, S, and Assmann, SM (2003). Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature*, **423** (6940): 651–654.
- Cowen, DS, Lazarus, HM, Shurin, SB, Stoll, SE, and Dubyak, GR (1989). Extracellular adenosine triphosphate activates calcium mobilization in human phagocytic leukocytes and neutrophil/monocyte progenitor cells. *J Clin Invest*, **83** (5): 1651–1660.

- Cuvillier, O, Pirianov, G, Kleuser, B, Vanek, PG, Coso, OA, Gutkind, S, and Spiegel, S (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, **381** (6585): 800-803.
- Cuvillier, O, Edsall, L, and Spiegel, S (2000). Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J Biol Chem*, **275** (21): 15691-15700.
- Cuvillier, O, Nava, VE, Murthy, SK, Edsall, LC, Levade, T, Milstien, S, and Spiegel, S (2001). Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ*, **8** (2): 162-171.
- Cuvillier, O, and Levade, T (2001). Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood*, **98** (9): 2828-2836.
- Czeloth, N, Bernhardt, G, Hofmann, F, Genth, H, and Förster, R (2005). Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. *J Immunol*, **175** (5): 2960-2967.
- Dalziel, HH, and Westfall, DP (1994). Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: Subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev*, **46** (4): 449-466.
- Davis, PD, Hill, CH, Lawton, G, Nixon, JS, Wilkinson, SE, Hurst, SA, Keech, E, and Turner, SE (1992). Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-Bisarylmaleimides. *J Med Chem*, **35** (1): 177-184.
- Dennis, RD, Geyer, R, Egge, H, Peter-Katalinic, J, Li, SC, Stirm, S, and Wiegandt, H (1985). Glycosphingolipids in insects. Chemical structures of ceramide tetra-, penta-, hexa-, and heptasaccharides from *Calliphora vicina* pupae (Insecta: Diptera). *J Biol Chem*, **260** (9): 5370-5375.
- Dixon, CJ, Cobbold, PH, and Green, AK (1995). Actions of ADP, but not ATP, on cytosolic free Ca²⁺ in single rat hepatocytes mimicked by 2-methylthioATP. *Br J Pharmacol*, **116** (3):1979-1984.
- Dixon, CJ, Bowler, WB, Fleetwood, P, Ginty, AF, Gallagher, JA; and Carron, JA (1997). Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells via P2-purinoreceptors. *Br J Cancer*, **75** (1): 34-39.
- Dixon, AK, Widdowson, L ,and Richardson, PJ (1997). Desensitization of the adenosine A1 receptor by the A2A receptor in the rat striatum. *J Neurochem*, **69** (1): 315-321.
- Dixon, CJ, Bowler, WB, Walsh, CA, and Gallagher, JA (1997). Effects of extracellular nucleotides on single cells and populations of human osteoblasts: Contribution of cell heterogeneity to relative potencies. *Br J Pharmacol*, **120** (5):777-780.
- Döll, F, Pfeilschifter J, and Huwiler, A (2005). The epidermal growth factor stimulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human mammary carcinoma cell line MCF7. *Biochim. Biophys. Acta*. **1738** (1-3): 72-81.
- Doyle, A, Morris, CB, and Armitage, WJ, (1993). Cryopreservation of animal cells. *Adv Biotechnol Processes*, **7** : 1-17.
- Drury, AN, and Szent-Györgyi, A (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, **68** (3): 213-237.
- Dubyak, GR, and el-Moatassim, C (1993). Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol*, **265** (3 Pt 1): C577-C606.
- Edsall, LC, van Brocklyn, JR, Cuvillier, O, Kleuser, B, and Spiegel, S (1998). N,N-Dimethylsphingosine is a potent competitive inhibitor of sphingosine kinase but not of protein kinase C: modulation of cellular levels of sphingosine 1-phosphate and ceramide. *Biochemistry*, **37** (37): 12892-12898.
- Edsall, LC, Pirianov, GG, and Spiegel, S (1997). Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J. Neurosci*, **17** (18): 6952-6960.

- Edwards, FA, and Gibb, AJ (1993). ATP: A fast transmitter. *FEBS Lett*, **325** (1-2): 86–89.
- Ehring, GR, Szabo, IL, Jones, MK, Sarfeh, IJ, and Tarnawski, AS (2000). ATP-induced Ca^{2+} -signaling enhances rat gastric microvascular endothelial cell migration. *J. Physiol. Pharmacol*, **51** (4 Pt 2): 799–811.
- El Bawab, S, Bielawska, A, and Hannun, YA (1999). Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain. *J Biol Chem*, **274** (39): 27948-27955.
- El Bawab, S, Roddy, P, Qian, T, Bielawska, A, Lemasters, JJ, and Hannun, YA. (2000). Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem*, **275** (28): 21508-21513.
- el-Moatassim, C, and Dubyak, GR (1992). A novel pathway for the activation of phospholipase D by P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. *J Biol Chem*, **267** (33): 23664–23673.
- el-Moatassim, C, and Dubyak, GR (1993). Dissociation of the pore-forming and phospholipase D activities stimulated via P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. *J Biol Chem*, **268** (21): 15571–15578.
- English, D, Kovala, AT, Welch, Z, Harvey, KA, Siddiqui, RA, Brindley, DN, and Garcia, JG (1999). Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J Hematother Stem Cell Res*, **8** (6): 627-6234.
- Eto, M, Bennouna, J, Hunter, OC, Lotze, MT, and Amoscato, AA (2006). Importance of C16 ceramide accumulation during apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Urol*, **13** (2): 148-156.
- Evans, RJ, Derkach, V, and Surprenant, A (1992). ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*, **357** (6378): 503–505.
- Exton, JH. (1997). Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol Rev*, **77** (2): 303-320.
- Falluel-Morel, A, Vaudry, D, Aubert, N, Galas, L, Benard, M, Basille, M, Fontaine, M, Fournier, A, Vaudry, H, and Gonzalez, BJ (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents the effects of ceramides on migration, neurite outgrowth, and cytoskeleton remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102** (7): 2637-2642.
- Falluel-Morel, A, Vaudry, D, Aubert, N, Galas, L, Benard, M, Basille, M, Fontaine, M, Fournier, A, Vaudry, H, and Gonzalez, BJ (2006). PACAP and ceramides exert opposite effects on migration, neurite outgrowth, and cytoskeleton remodeling. *Ann NY Acad Sci*, **1070** : 265-270.
- Feoktistov, I, and Biaggioni, I (1995). Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells: An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest*, **96** (4):1979–1986.
- Ferlinz, K, Kopal, G, Bernardo, K, Linke, T, Bar, J, Breiden, B, Neumann, U, Lang, F, Schuchman, EH, and Sandhoff, K (2001). Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting. *J Biol Chem*, **276** (38): 35352-35360.
- Filtz, TM, Li, Q, Boyer, JL, Nicholas, RA, and Harden, TK (1994). Expression of a cloned P2Y-purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol Pharmacol*, **46** (1): 8–14.
- Floege, J, Radeke, HR, and Johnson, RJ. (1994). Glomerular cells in vitro versus the glomerulus in vivo. *Kidney Int*, **45** (2): 360-368.
- Franzen, R, Pautz, A, Bräutigam, L, Geisslinger, G, Pfeilschifter, J, and Huwiler, A. (2001). Interleukin-1 β induces chronic activation and de novo synthesis of neutral ceramidase in renal mesangial cells. *J Biol Chem*, **276** (38): 35382-35389.

Franzen, R, Fabbro, D, Aschrafi, A, Pfeilschifter, J, and Huwiler, A. (2002). Nitric oxide induces degradation of the neutral ceramidase in rat renal mesangial cells and is counterregulated by protein kinase C. *J Biol Chem*, **277** (48): 46184-46190.

Franzen, R, Pfeilschifter, J, and Huwiler, A. (2002). Nitric oxide induces neutral ceramidase degradation by the ubiquitin/proteasome complex in renal mesangial cell cultures. *FEBS Lett*, **532** (3):441-444.

Fredholm, BB, Proctor, W, van der Ploeg, I, and Dunwiddie, TV (1989). In vivo pertussis toxin treatment attenuates some, but not all, adenosine A1 effects in slices of the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*, **172** (3): 249–262.

Fredholm, BB, Abbracchio, MP, Burnstock, G, Daly, JW, Harden, KT, Jacobson, KA, Leff, P, and Williams, M (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev*, **46** (2): 143–156.

Fredholm, BB (1995). Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol Toxicol*, **76** (4): 228–239.

Freeman, M, and Gurdon, JB (2002). Regulatory principles of developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18** : 515-539.

Freissmuth, M, Schütz, W, and Linder, ME (1991). Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G-protein α -subunits. Selectivity for rG α 3. *J Biol Chem*, **266** (Pt 3): 17778–17783.

French, KJ, Schrecengost, RS, Lee, BD, Zhuang, Y, Smith, SN, Eberly JL, Yun, JK, and Smith, CD (2003). Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res*, **63** (18): 5962–5969.

García-Sánchez, A, Cerrato, R, Larrasa, J, Ambrose, NC, Parra, A, Alonso, JM, Hermoso-de-Mendoza, M, Rey, JM, and Hermoso-deMendoza, J (2004). Identification of an alkaline ceramidase gene from *Dermatophilus congolensis*. *Vet Microbiol*, **99** (1): 67-74.

Gennero, I, Fauvel, J, Nieto, M, Cariven, C, Gaits, F, Briand-Mesange, F, Chap, H, and Salles, JP (2002). Apoptotic effect of sphingosine 1-phosphate and increased sphingosine 1-phosphate hydrolysis on mesangial cells cultured at low cell density. *J Biol Chem*, **277** (15): 12724–12734.

Geoffroy, K, Wiernsperger, N, Lagarde, M, and El Bawab, S (2004). Bimodal effect of advanced glycation end products on mesangial cell proliferation is mediated by neutral ceramidase regulation and endogenous sphingolipids. *J Biol Chem*, **279** (33): 34343-34352.

Geoffroy, K, Troncy, L, Wiernsperger, N, Lagarde, M, and El Bawab, S (2005). Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels. *FEBS Lett*, **579** (5): 1249-1254.

Gerwins, P, and Fredholm, BB (1995). Activation of adenosine A1 and bradykinin receptors increases protein kinase C and phospholipase D activity in smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **351** (2): 186–193.

Gerwins, P, and Fredholm, BB (1995). Activation of phospholipase C and phospholipase D by stimulation of adenosine A1, bradykinin or P2U receptors does not correlate well with protein kinase C activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **351** (2): 194–201.

Gillespie, JH (1934). The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol*, **80** (4): 345–349.

Goetzl, EJ, and An, S (1998). Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J*, **12** (15):1589-1598.

Gomez-Munoz, A, Frago, LM, Alvarez, L, and Varela-Nieto, I. (1997). Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide-1-phosphate. *Biochem J*, **325** (Pt 2): 435-440.

Goparaju, SK, Jolly, PS, Watterson, KR, Bektas, M, Alvarez, S, Sarkar, S, Mel, L, Ishii, I, Chun, J, Milstien, S, and Spiegel, S (2004). The S1P2 Receptor Negatively Regulates Platelet-Derived Growth Factor-Induced Motility and Proliferation. *Mol Cell Biol*, **25** (10): 4237–4249.

Gordon, JL (1986). Extracellular ATP: Effects, sources and fate. *Biochem J* **233** (2): 309–319.

Grey, A, Xu, X, Hill, B, Watson, M, Callon, K, Reid, IR, and Cornish, J (2004). Osteoblastic cells express phospholipid receptors and phosphatases and proliferate in response to sphingosine-1-phosphate. *Calcif Tissue Int*, **74** (6): 542-550.

Grierson, JP, and Meldolesi, J (1995). Shear stress-induced $[Ca^{2+}]_i$ transients and oscillations in mouse fibroblasts are mediated by endogenously released ATP. *J Biol Chem*, **270** (9): 4451–4456.

Hait, NC, Sarkar, S, Le Stunff, H, Mikami, A, Maceyka, M, Milstien, S, and Spiegel, S (2005). Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. *J Biol Chem*, **280** (33): 29462–29469.

Hakamori, S. (1981). Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem*, **50** : 733-764.

Hanafusa, N, Yatomi, Y, Yamada, K, Hori, Y, Nangaku, M, Okuda, T, Fujita, T, Kurokawa, K, and Fukagawa, M (2002). Sphingosine 1-phosphate stimulates rat mesangial cell proliferation from outside the cells. *Nephrol Dial Transplant*, **17** (4): 580-586.

Hanna, AN, Chan, EY, Xu, J, Stone, JC, and Brindley, DN (1999). A novel pathway for tumor necrosis factor-alpha and ceramide signaling involving sequential activation of tyrosine kinase, p21(ras), and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, **274** (18): 12722-12729.

Hannun, YA, Loomis, CR, Merrill, AH Jr., and Bell, RM. (1986). Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem*, **261** (27): 12604-12609.

Hannun, YA, and Bell, RM (1987). Lysosphingolipids inhibit protein kinase C: implications for the sphingolipidoses. *Science*, **235** (4789): 670-674.

Hannun, YA, and Bell, RM (1987). Mechanism of activation of protein kinase C: role of diacylglycerol and calcium second messengers. *Soc Gen Physiol Ser*, **42** : 229-240.

Hannun, YA, and Bell, RM (1989). Regulation of protein kinase C by sphingosine and lysosphingolipids. *Clin Chim Acta*, **185** (3): 333-345.

Hannun, YA, and Luberto, C (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol*, **10** (2): 73-80.

Hannun, YA, Luberto, C and Argraves, KM (2001). Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry*, **40** (16): 4893-4903.

Hannun, YA. (1994). The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem*, **269** (5): 3125-3128.

Hannun, YA. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, **274** (5294): 1855-1859.

Harada, J, Foley, M, Moskowitz, MA, and Waeber, Ch (2004). Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *J Neurochem*, **88** (4): 1026–1039.

Hasuo H, Shoji S, Gallagher JP and Akasu T (1992). Adenosine inhibits the synaptic potentials in rat septal neurons mediated through pre- and postsynaptic A1- adenosine receptors. *Neurosci Res*, **13** (4): 281–299.

- Hayakawa, M, Jayadev, S, Tsujimoto, M, Hannun, YA, and Ito, F (1996). Role of ceramide in stimulation of the transcription of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2. *Biochem Biophys Res Commun*, **220** (3): 681-686.
- Hla, T, and Macaig, T (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, **265** (16): 9308-9313.
- Hla, T, Lee, MJ, Ancellin, N, Liu, CH, Thangada, S, Thompson, BD, and Kluk, M (1999). Sphingosine-1-phosphate: extracellular mediator or intracellular second messenger? *Biochem Pharmacol*, **58** (2): 201-207.
- Hla, T. (2001). Sphingosine 1-phosphate receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **64** (1-4): 135-142.
- Ho, C, Hicks, J, and Salter, MW (1995). A novel P2-purinoreceptor expressed by a subpopulation of astrocytes from the dorsal spinal cord of the rat. *Br J Pharmacol*, **116** (7): 2909–2918.
- Hoiting, B, Molleman, A, Nelemans, A, and Den Hertog, A (1990). P2-purinoreceptor activated membrane currents and inositol tetrakisphosphate formation are blocked by suramin. *Eur J Pharmacol*, **181** (1-2): 127–131.
- Honda, S, Sasaki, Y, Ohsawa, K, Imai, Y, Nakamura, Y, Inoue, K, and Kohsaka, S (2001). Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci*, **21** (6): 1975–1982.
- Höpfner, M, Lemmer, K, Jansen, A, Hanski, C, Riecken, EO, Gavish, M, Mann, B, Buhr, H, Glassmeier, G, and Scherübl, H (1998). Expression of functional P2-purinergic receptors in primary cultures of human colorectal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **251** (3): 811-817.
- Huang, Y, Tanimukai, H, Liu, F, Iqbal, K, Grundke-Iqbal, I, and Gong, CX (2004). Elevation of the level and activity of acid ceramidase in Alzheimer's disease brain. *Europ J Neurosci* **20**: 3489-3497.
- Humphreys, BD, and Dubyak, GR (1996). Induction of the P2Z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. *J Immunol*, **157** (12): 5627–5637.
- Hünemann, G, Schirmacher, A, Ringelstein, B, Young, P, Watts, GD, Meuleman, J, Nelis, E, Chance, PF, Timmerman, V, Stögbauer, F, and Kühlenbäumer, G (2004). Genomic organization and mutation analysis of three candidate genes for hereditary neuralgic amyotrophy. *Muscle Nerve*, **29** (4): 601–604.
- Huwiler, A, and Pfeilschifter, J (1994). Stimulation by extracellular ATP and UTP of the mitogen-activated protein kinase cascade and proliferation of rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol*, **113** (4): 1455–1463.
- Huwiler, A, Stabel, S, Fabbro, D, and Pfeilschifter, J (1995). Platelet-derived growth factor and angiotensin II stimulate the mitogen-activated protein kinase cascade in renal mesangial cells: comparison of hypertrophic and hyperplastic agonists. *Biochem J*, **305** (Pt 3): 777–784.
- Huwiler, A, Brunner, J, Hummel, R, Vervoordeldonk, M, Stabel, S, van den Bosch, H, and Pfeilschifter, J. (1996). Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sc USA*, **93** (14): 6959-6963.
- Huwiler A, and Pfeilschifter, J (1996). Nitric oxide stimulates stress-activated protein kinases in glomerular endothelial and mesangial cells. *FEBS Lett*. 1996 Oct 28; **396** (1): 67-70.
- Huwiler, A, Staudt, G, Kramer, RM, and Pfeilschifter, J (1997). Cross-talk between secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta*, **1348** (3): 257-272.

- Huwiler, A, Briner, VA, Fabbro, D, and Pfeilschifter, J (1997). Feedback regulation of extracellular ATP-stimulated phosphoinositide hydrolysis by protein kinase C- α in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int*, **52** (2): 329–337.
- Huwiler, A, van Rossum, G, Wartmann, M, and Pfeilschifter, J (1997). Stimulation by extracellular ATP and UTP of the stress-activated protein kinase cascade in rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol*, **120** (5): 807–812.
- Huwiler, A, Pfeilschifter, J, and van den Bosch, H (1999). Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem*, **274** (11): 7190–7195.
- Huwiler, A, Wartmann, M, van den Bosch, H, and Pfeilschifter, J (2000). Extracellular nucleotides activate the p38-stress-activated protein kinase cascade in glomerular mesangial cells. *Br J Pharmacol*, **129** (3): 612–618.
- Huwiler, A, Kolter, T, Pfeilschifter, J, and Sandhoff, K (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1485** (2-3): 63–99.
- Huwiler, A, Rölz, W, Dorsch, S, Ren, S, and Pfeilschifter, J (2002). Extracellular ATP and UTP activate the protein kinase B/Akt cascade via the P2Y2 purinoceptor in renal mesangial cells. *Br J Pharmacol*, **136** (4): 520–529.
- Huwiler, A, Döll, F, Ren, S, Klawitter, S, Greening, A, Römer, I, Bubnova, S, Reinsberg, L, and Pfeilschifter, J (2006). Histamine increases sphingosine kinase-1 expression and activity in EA.hy 926 cells by a PKC- α -dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*, **1761** (3): 367–376.
- Ibitayo, AI, Tsunoda, Y, Nozu, F, Owyang, C, and Bitar, KN (1998). Src kinase and PI 3-kinase as a transduction pathway in ceramide-induced contraction of colonic smooth muscle. *Am J Physiol*, **275** (4 Pt 1): G705-G711.
- Idzko, M, Dichmann, S, Ferrari, D, Di Virgilio, F, La Sala, A, Girolomoni, G, Panther, E, and Norgauer, J (2002). Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2Y receptors. *Blood*, **100** (3): 925–932.
- Idzko, M, Panther, E, Corinti, S, Morelli, A, Ferrari, D, Herouy, Y, Dichmann, S, Mockenhaupt, M, Gebicke-Haerter, P, Di Virgilio, F, Girolomoni, G, Norgauer, J (2002). Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. *FASEB J*, **16** (6): 625–627.
- Igarashi, Y (1997). Functional roles of sphingosine, sphingosine 1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signaling pathways. *J Biochem (Tokyo)*, **122** (6): 1080-1087.
- Igarashi, Y, Sadahira, Y, Yamamura, S, and Hakomori, S (1997). Inhibition of mouse B16 melanoma cell motility by sphingosine 1-phosphate. *Adv Exp Med Biol*, **400B**: 693-698.
- Igarashi, N, Okada, T, Hayashi, S, Fujita, T, Jahangeer, S, and Nakamura, S (2003). Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J Biol Chem*, **278** (47): 46832–46839.
- Imamura, T, Ohgane, J, Ito, S, Ogawa, T, Hattori, N, Tanaka, S and Shiota, K (2001). CpG island of rat sphingosine kinase-1 gene: tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons. *Genomics*, **76** (1-3): 117–125.
- Imamura, T, Miyauchi-Senda, N, Tanaka, S, and Shiota, K (2004). Identification of genetic and epigenetic similarities of SPHK1/Sphk1 in mammals. *J Vet Med Sci*, **66** (11): 1387–1393.
- Inagaki, Y, Li, PY, Wada, A, Mitsutake, S, and Igarashi, Y (2003). Identification of functional nuclear export sequences in human sphingosine kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **311** (1): 168-173.
- Iwabuchi, K, Zhang, Y, Handa, K, Withers, DA, Sinay, P, and Hakomori, S (2000). Reconstitution of membranes simulating “glycosignaling domain” and their susceptibility to lyso-GM3. *J Biol Chem*, **275** (20): 15174-15181.

Jacobson, KA, van Galen, PJM, and Williams, M (1992). Adenosine receptors: Pharmacology, structure-activity relationships, and therapeutic potential. *J Med Chem*, **35** (3): 407–422.

Jarvis, WD, Fornari, FA, Auer, KL, Freerman, AJ, Szabo, E, Birrer, MJ, Johnson, CR, Barbour, SE, Dent, P, and Grant, S (1997). Coordinate regulation of stress- and mitogen-activated protein kinases in the apoptotic actions of ceramide and sphingosine. *Mol Pharmacol*, **52** (6): 935-947.

Jarvis, WD, Fornari, FA jr., Tombes, RM, Erukulla, RK, Bittman, R, Schwartz, GK, Dent, P, and Grant, S (1998). Evidence for involvement of mitogen-activated protein kinase, rather than stress-activated protein kinase, in potentiation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced apoptosis by interruption of protein kinase C signaling. *Mol Pharmacol*, **54** (5): 844-856.

Jefferson, AB, and Schulman, H (1988). Sphingosine inhibits calmodulin-dependent enzymes. *J Biol Chem*, **263** (30): 15241-15244.

Johnson, CR, Charlton, SJ, and Hourani, SMO (1996). Responses of the longitudinal muscle and the muscularis mucosae of the rat duodenum to adenine and uracil nucleotides. *Br J Pharmacol*, **117** (5): 823–830.

Johnson, KR, Becker, KP, Facchinetti, MM, Hannun, YA, and Obeid, LM (2002). PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane: extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J Biol Chem*, **277** (38): 35257-32562.

Johnson, KR, Johnson, KY, Crellin, HG, Ogretmen, B, Boylan, AM, Harley, RA, and Obeid, LM (2005). Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue. *J Histochem Cytochem*, **53** (9): 1159-1166.

Jolly, PS, Bektas, M, Olivera, A, Gonzalez-Espinosa, C, Proia, RL, Rivera, J, Milstien, S, and Spiegel, S (2004). Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med*, **199** (7): 959-970.

Jones, GH (1976). A rapid assay for the binding of actinomycin to DNA. *Anal Biochem*, **71** (2): 376-383.

Kaczmarek, E, Erb, L, Koziak, K, Jarzyna, R, Wink, MR, Guckelberger, O, Blusztajn, JK, Trinkaus-Randall, V, Weisman, GA, and Robson, SC (2005). Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides. Involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost*, **93** (4): 735-742.

Kågedal, K, Zhao, M, Svensson, I, and Brunk, UT (2001). Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J*, **359** (Pt 2): 335-343.

Kaneider, NC, Djanani, A, Fischer-Colbrie, R, and Wiedermann, CJ (2002). Sphingosine kinase-dependent directional migration of leukocytes in response to phorbol ester. *Biochem Biophys Res Commun*, **297** (4): 806-810.

Kaneider, NC, Kaser, A, Dunzendorfer, S, Tilg, H, and Wiedermann, C et al.(2005), Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment. *J Virol*, **77** (9): 5535–5539.

Katsuma, S, Hada, Y, Ueda, T, Shiojima, S, Hirasawa, A, Tanoue, A, Takagaki, K, Ohgi, T, Yano, J, and Tsujimoto, G (2002). Signalling mechanisms in sphingosine 1-phosphate-promoted mesangial cell proliferation. *Genes Cells*, **7** (12): 1217–1230.

Kaufmann, A, Musset, B, Limberg, SH, Renigunta, V, Sus, R, Dalpke, AH, Heeg, KM, Robaye, B, and Hanley, P (2005). “Host Tissue Damage” signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates Toll-like receptor signaling in human monocytes. *J Biol Chem*, **280** (37): 32459–32467.

- Kawa, S, Kimura, S, Hakamori, S, and Igarashi, Y (1997). Inhibition of chemotactic motility and trans-endothelial migration of human neutrophils by sphingosine 1-phosphate. *FEBS Lett*, **420** (2-3): 196-200.
- Kawamori, T, Osta, W, Johnson, KR, Pettus, BJ, Bielawski, J, Tanaka, T, Wargovich, MJ, Reddy, BS, Hannun, YA, Obeid, LM, and Zhou, D (2006). Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *FASEB J*, **20** (2): 386–388.
- Keely, PJ (2001). Ras and Rho protein induction of motility and invasion in T47D breast adenocarcinoma cells. *Methods Enzymol*, **333** : 256-266.
- Kharel, Y, Lee, S, Snyder, AH, Sheasley-O'Neill, SL, Morris, MA, Setiady, Y, Zhu, R, Zigler, MA, Burcin, TL, Ley, K, Tung, KS, Engelhard, VH, Macdonald, TL, Pearson-White, S, and Lynch, KR (2005). Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. *J Biol Chem*, **280** (44): 36865-36872.
- Kierszenbaum, A (2002). Histology and cell biology. 1. Auflage. Mosby.
- Kim, DS, Kim, SY, Kleuser, B, Schäfer-Korting, M, Kim, KH, and Park, KC (2004). Sphingosine-1-phosphate inhibits human keratinocyte proliferation via Akt/protein kinase B inactivation. *Cell Signal*, **16** (1): 89–95.
- Kim, MK, Lee, HY, Kwak, JY, Park, JI, Yun, J, and Bae, YS (2006). Sphingosine-1-phosphate stimulates rat primary chondrocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, **345** (1): 67–73.
- Klepeis, VE, Weinger, I, Kaczmarek, E, and Trinkaus-Randall, V (2004). P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *J Cell Biochem*, **93** (6): 1115–1133.
- Koch, J, Gartner, S, Li, CM, Quintern, LE, Bernardo, K, Levrán, O, Schnabel, D, Desnick, RJ, Schuchman, EH, and Sandhoff, K (1996). Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase. Identification of the first molecular lesion causing Farber disease. *J Biol Chem*, **271** (51): 33110-33115.
- Kohama, T, Olivera, A, Edsall, L, Nagiec, MM, Dickson, R, and Spiegel, S (1998). Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem*, **273** (37): 23722–23728.
- Kohno, T, Matsuyuki, H, Inagaki, Y, and Igarashi, Y (2003). Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/S1P4-expressing cells. *Genes Cells*, **8** (8): 685-697.
- Kohno, M, Momoi, M, Oo, ML, Paik, JH, Lee, YM, Venkataraman, K, Ai, Y, Ristimaki, AP, Fyrst, H, Sano, H, Rosenberg, D, Saba, JD, Proia, RL, and Hla, T (2006). Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol*, **26** (19): 7211–7223.
- Kolesnick, RN, and Krönke, M (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, **60**: 643-665.
- Kon, J, Sato, K, Watanabe, T, Tomura, H, Kuwabara, A, Kimura, T, Tamama, K, Ishizuka, T, Murata, N, Kanda, T, Kobayashi, I, Ohta, H, Ui, M, and Okajima, F (1999). Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signaling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **274** (34): 23940-23947.
- Kono, M, Yide, M, Yujing, L, Teijii, S, Allende, ML, Wu, YP, Yamashita, T, and Proia, RL (2004). The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem*, **279** (28): 29367–29373.
- Koval, M, and Pagano, RE (1991). Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta*, **1082** (2): 113-125.
- Kuokkanen, S, Gschwend, M, Rioux, JD, Daly, MJ, Terwilliger, JD, Tienari, PJ, Wikstrom, J, Palo, J, Stein, LD, Hudson, TJ, Lander, ES, and Peltonen, L (1997). Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families. *Am J Hum Genet*, **61** (6): 1379–1387.

- Kyhse-Andersen, J (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10** (3-4): 203-209.
- La Sala, A, Sebastiani, S, Ferrari, D, Di Virgilio, F, Idzko, M, Norgauer, J, and Girolomi, G (2002). Dendritic cells exposed to extracellular adenosine triphosphate acquire the migratory properties of mature cells and show a reduced capacity to attract type 1 T lymphocytes. *Blood*, **99** (5): 1715-1722.
- Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259): 680-685.
- Lee, WK, Choi, SW, Lee, HR, Lee, EJ, Lee, KH, and Kim HO (2001). Purinoceptor-mediated calcium mobilization and proliferation in HaCaT keratinocytes. *J Dermatol Sci*, **25** (2): 97-105.
- Lee, H, Liao, JJ, Graeler, M, Huang, MC, and Goetzl, EJ (2002). Lysophospholipid regulation of mononuclear phagocytes. *Biochem Biophys Acta*, **1582** (1-3): 175-177.
- Lee, C, Xu, DZ, Feketeova, E, Kannan, KB, Yun, JK, Deitch, EA, Fekete, Z, Livingston, DH, and Hauser, CJ (2004). Attenuation of shock-induced acute lung injury by sphingosine kinase inhibition. *J Trauma*, **57** (5): 955-960.
- Leevers, SJ, Vanhaesebroeck, B, and Waterfield, MD (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*, **11** (2): 219-225.
- Leipzig, J (2003). Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*, **284** (3): F419-F432.
- Léon, C, Vial, C, Cazenave, J-P, and Gachet, C (1995). Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoceptor. *Gene*, **171** (2): 295-297.
- Léon, C, Hechler, B, Vial, C, Leray, C, Cazenave, J-P, and Gachet, C (1997). The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett*, **403** (1): 26-30.
- Lepley, D, Paik, JH, Hla, T, and Ferrer, F (2005). The G Protein-Coupled Receptor S1P2 Regulates Rho/Rho Kinase Pathway to Inhibit Tumor Cell Migration. *Cancer Res*, **65** (9): 3788-3795.
- Levade, T, Moser, HW, Fensom, AH, Harzer, K, Moser, AB, and Salvayre, R (1995). Neurodegenerative course in ceramidase deficiency (Farber disease) correlates with the residual lysosomal ceramide turnover in cultured living patient cells. *J Neurol Sci*, **134** (1-2): 108-114.
- Levade, T, and Jaffrézou, JP (1999). Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta*, **1438** (1): 1-17.
- Li, CM, Hong, SB, Kopal, G, He, X, Linke, T, Hou, WA, Koch, J, Gatt, S, Sandhoff, K, and Schuchman, EH (1998). Cloning and characterization of the full-length cDNA and genomic sequences encoding murine acid ceramidase. *Genomics*, **50** (2): 267-274.
- Li, W, Zhang, J, Flechner, L, Hyun, T, Yam, A, Franke, TF, and Pierce, JH (1999). Protein kinase C- α overexpression stimulates Akt activity and suppresses apoptosis induced by interleukin 3 withdrawal. *Oncogene*, **18** (1): 6564-6572.
- Linardic, CM, and Hannun, YA (1994). Identification of a distinct pool of sphingomyelin involved in the sphingomyelin cycle. *J Biol Chem*, **269** (38): 23530-23537.
- Liu, B, Obeid, LM, and Hannun, YA (1997). Sphingomyelinases in cell regulation. *Semin Cell Dev Biol*, **8** (3): 311-322.
- Liu, H, Sugiura, M, Nava, VE, Edsall, LC, Kono, K, Poulton, S, Milstien, S, Kohama, T, and Spiegel, S (2000). Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem*, **275** (26): 19513-19520.

- Liu, H, Chakravarty, D, Maceyka, M, Milstien, S, and Spiegel, S (2002). Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **71** : 493-511.
- Lockman, K, Hinson, JS, Medlin, MD, Morris, D, Taylor, JM, and Mack, CP (2004). Sphingosine 1-phosphate stimulates smooth muscle cell differentiation and proliferation by activating separate serum response factor co-factors. *J Biol Chem*, **279** (41): 42422-42430.
- MacKinnon, AC, Buckley, A, Chilvers, ER, Rossi, AG, Haslett, C, and Sethi, T (2002). Sphingosine kinase: a point of convergence in the action of diverse neutrophil priming agents. *J Immunol*, **169** (11): 6394-6400.
- Maceyka, M, Payne, SG, Milstien, S, and Spiegel, S (2002). Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1585** (2-3): 193-201.
- Maceyka, M, Sankala, H, Hait, NC, Le Stunff, H, Liu, H, Toman, R, Collier, C, Zhang, M, Satin, LS, Merrill, AH, Milstien, S, and Spiegel, S (2005). SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem*, **280** (44): 37118-37129.
- Malchinkhuu, E, Sato, K, Horiuchi, Y, Mogi, C, Ohwada, S, Ishiuchi, S, Saito, N, Kurose, H, Tomura, H, and Okajima, F (2005). Role of p38 mitogen-activated kinase and c-Jun terminal kinase in migration response to lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in glioma cells. *Oncogene*, **24** (44): 6676-6688.
- Malik, ZA, Thompson, CR, Hashimi, S, Porter, B, Iyer, SS, and Kusners, DJ (2003). Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase 1. *J Immunol*, **170** (6): 2811-2815.
- Mandala, SM, Thornton, R, Tu, Z, Kurtz, MB, Nickel, J, Broach, J, Menzeleev, R, and Spiegel, S (1998). Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** (1): 150-155.
- Mandala, SM, Thornton, R, Galve-Roperh, I, Poulton, S, Peterson, C, Olivera, A, Bergstrom, J, Kurtz, MB, and Spiegel, S (2000). Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97** (14): 7859-7864.
- Mandala, S, Hajdu, R, Bergstrom, J, Quackenbush, E, Xie, J, Milligan, J, Thornton, R, Shei, GJ, Card, D, Keohane, C, Rosenbach, M, Hale, J, Lynch, CL, Rupprecht, K, Parsons, W, and Rosen, H (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor antagonists. *Science*, **296** (5566): 346-349.
- Mao, C, Xu, R, Bielawska, A, Szulc, ZM, and Obeid, LM (2000). Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. *J Biol Chem*, **275** (40): 31369-31378.
- Mao, C, Xu, R, Szulc, ZM, Bielawska, A, Galadari, SH, and Obeid, LM (2001). Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyses phytoceramide. *J Biol Chem*, **276** (28): 26577-26588.
- Matsubara, S, and Ozawa, M (2001). Expression of alpha-catenin in alpha-catenin deficient cells increases resistance to sphingosine-induced apoptosis. *J Cell Biol*, **154** (3): 573-584.
- McCloskey, MA, Fan, Y, and Luther, S (1999). Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J Immunol*, **163** (2): 970-977.
- McDonald, OB, Hannun, YA, Reynolds, CH, and Sahyoun, N (1991). Activation of casein kinase II by sphingosine. *J Biol Chem*, **266** (32): 21773-21776.
- Megson, AC, Dickenson, JM, Townsend-Nicholson, A, and Hill, SJ (1995). Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1- receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol*, **115** (8): 1415-1424.

- Melendez, A, Floto, RA, Gillooly, DJ, Harnett, MM, and Allen, JM (1998). FcγRI coupling to phospholipase D initiates sphingosine kinase mediated calcium mobilization and vesicular trafficking. *J Biol Chem*, **273** (16): 9363-9402.
- Melendez, AJ, Carlos-Dias, E, Gosink, M, Allen, JM, and Takacs, L (2000). Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene*, **251** (1): 19-26.
- Melendez, AJ, and Khaw, AK (2002). Dichotomy of Ca²⁺ signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. *J Biol Chem*, **277** (19): 17255-17262.
- Melendez, AJ, and Allen, JM (2002). Phospholipase D and immune receptor signalling. *Semin Immunol*, **14** (1): 49-55.
- Melendez, AJ, and Ibrahim, FB (2004). Antisense knockdown of sphingosine kinase 1 in human macrophages inhibits C5a receptor-dependent signal transduction, Ca²⁺ signal, enzyme release, cytokine production, and chemotaxis. *J Immunol*, **173** (3): 1596-1603.
- Merrill, AH jr., Schmelz, EM, Dillehay, DL, Spiegel, S, Shayman, JA, Schroeder, JJ, Riley, RT, Voss, KA, and Wang, E (1997). Sphingolipids – the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol*, **142** (1): 208-225.
- Merrill, AH jr., and Jones, DD (1990). An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta*, **1044** (1): 1-12.
- Meyer, T, Regenass, U, Fabbro, D, Alteri, E, Rosel, J, Muller, M, Caravatti, G, and Matter, A (1989). A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. *Int J Cancer*, **43** (5): 851-856.
- Michoud, MC, Napolitano, G, Maghni, K, Govindaraju, V, Cogo, A, and Martin, JG (2002). Effects of extracellular triphosphate nucleotides and nucleosides on airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **27** (6): 732-738.
- Milosevic, J, Brandt, An, Roemuss, U, Arnold, A, Wegner, F, Schwarz, SC, Storch, A, Zimmermann, H, and Schwarz, J (2006). Uracil nucleotides stimulate human neural precursor cell proliferation and dopaminergic differentiation: involvement of MEK/ERK signalling. *J Neurochem*, **99** (3): 913-923.
- Min, J, Stegner, AL, Alexander, H, and Alexander, S (2004). Overexpression of sphingosine-1-phosphate lyase or inhibition of sphingosine kinase in Dictyostelium discoideum results in a selective increase in sensitivity to platinum-based chemotherapy drugs. *Eukaryot Cell*, **3** (3): 795-805.
- Min, J, Traynor, D, Stegner, AL, Zhang, L, Hanigan, MH, Alexander, H, and Alexander, S (2005). Sphingosine kinase regulates the sensitivity of Dictyostelium discoideum cells to the anticancer drug cisplatin. *Eukaryot Cell*, **4** (1): 178-189.
- Mitsutake, S, Tani, M, Okino, N, Mori, K, Ichinose, S, Omori, A, Iida, H, Nakamura, T, and Ito, M (2001). Purification, characterization, molecular cloning, and subcellular distribution of neutral ceramidase of rat kidney. *J Biol Chem*, **276** (28): 26249-26259.
- Mizugishi, K, Yamashita, T, Olivera, A, Miller, GF, Spiegel, S, and Proia, RL (2005). Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol*, **25** (24): 11113-11121.
- Molenaar, C, Teuben, JM, Heetebrij, RJ, Tanke, HJ, and Reedijk, J (2000). New insights in the cellular processing of platinum antitumor compounds, using fluorophore-labeled platinum complexes and digital fluorescence microscopy. *J Biol Inorg Chem*, **5** (5): 655-665.
- Momoi, T, Ben-Yoseph, Y, and Nadler, HL (1982). Substrate-specificities of acid and alkaline ceramidases in fibroblasts from patients with Farber disease and controls. *Biochem J*, **205** (2): 419-425.
- Monjusho, H, Okino, N, Tani, M, Maeda, M, Yoshida, M, and Ito, M (2003). A neutral ceramidase homologue from Dictyostelium discoideum exhibits an acidic pH optimum. *Biochem J*, **376** (Pt 2):473-439.

- Morales, A, Paris, R, Villanueva, A, Llacune, L, Garcia-Ruiz, C, and Fernández-Checa, JC (2007). Pharmacological inhibition or small interfering RNA targeting acid ceramidase sensitizes hepatoma cells to chemotherapy and reduces tumor growth in vivo. *Oncogene*, **26** (6): 905-916.
- Morrone, FB, Jacques-Silva, MC, Horni, AP, and Bernardi, A (2003). Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurooncol*, **64** (3): 211-218.
- Munger, KA, and Jackson, EK (1994). Effects of selective A1 receptor blockade on glomerular hemodynamics: Involvement of renin-angiotensin system. *Am J Physiol*, **267** (5 Pt 2): F783–F790.
- Munshi, R, Pang, I-H, Sternweis, PC, and Linden, J (1991). A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G_{i1}, G_{i2} and G_o. *J Biol Chem*, **266** (33): 22285–22289.
- Murate et al, 2001
- Murate, T, Banno, Y, T-Koizumi, K, Watanobe, K, Mori, N, Wada, A, Igarashi, Y, Tagaki, A, Kojimam, T, Asano, H, Akao, Y, Yoshida, S, Saito, H, and Nozawa, Y (2001). Cell type-specific localization of sphingosine kinase 1a in human tissues. *J Histochem Cytochem*, **49** (7): 845-855.
- Murrin, RJA, and Boarder, MR (1992). Neuronal 'nucleotide' receptor linked to phospholipase C and phospholipase D? Stimulation of PC12 cells by ATP analogs and UTP. *Mol Pharmacol*, **41** (3): 561–568.
- Nair, RP, Henseler, T, Jenisch, S, Stuart, P, Bichakjian, CK, Lenk, W, Westphal, E, Guo, SW, Christophers, E, Voorhees, JJ, and Elder, JT (1997). Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) b genome-wide scan. *Hum Mol Genet*, **6** (8): 1349–1356.
- Nakade, Y, Banno, Y, T-Koizumi, K, Hagiwara, K, Sobue, S, Koda, M, Suzuki, M, Kojima, T, Takagi, A, Asano, H, Nozawa, Y, and Murate, T (2003). Regulation of sphingosine kinase 1 gene expression by protein kinase C in a human leukemia cell line, MEG-O1. *Biochim Biophys Acta*, **1635** (2-3): 104–116.
- Nava, VE, Cuvillier, O, Edsall, LC, Kimura, K, Milstien, S, Gelmann, EP, and Spiegel, S (2000). Sphingosine enhances apoptosis of radiation-resistant prostate cancer cells. *Cancer Res*, **60** (16): 4468-4474.
- Nava, VE, Hobson, JP, Murthy, S, Milstien, S, and Spiegel, S (2002). Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Exp Cell Res*, **281** (1): 115-127.
- Nicholas, RA, Watt, WC, Lazarowski, ER, Li, Q, and Harden, K (1996). Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: Identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol*, **50** (2): 224–229.
- Nikolova-Karakashian, M, Morgan, ET, Alexander, C, Liota, DC, and Merrill, AH jr. (1997). Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 β . Implications for the regulation of cytochrome p450 2C11. *J Biol Chem*, **272** (30): 18718-18724.
- Nishizuka, Y (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*, **9** (7): 484-496.
- North, RA (1996). P2X purinoceptor plethora. *Semin Neurosci*, **8** (4): 187–194.
- Ogretmen, B, and Hannun, YA (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*, **4** (8): 604-616.
- Ohanian, J, Liu, G, Ohanian, V, and Heagerty, AM (1998). Lipid second messengers derived from glycerolipids and sphingolipids, and their role in smooth muscle function. *Acta Physiol Scand*, **164** (4): 533-548.

- Okada, T, Ding, G, Sonoda, H, Kajimoto, T, Haga, Y, Khosrowbeygi, A, Gao, S, Miwa, N, Jahangeer, S, and Nakamura, S (2005). Involvement of N-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis. *J Biol Chem*, **280** (43): 36318-36325.
- Okazaki, T, Bell, RM, and Hannun, YA (1989). Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J Biol Chem*, **264** (32): 19076-19080.
- Okazaki, T (1996). Sphingomyelin cycle: role in cell functions inducing apoptosis. *Seikagaku*, **68** (6):431-43.
- Okino, N, Ichinose, S, Omori, A, Imayama, D, Nakamura, T, and Ito, M (1999). Molecular cloning, sequencing, and expression of the gene encoding alkaline ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*. Cloning of a ceramidase homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, **274** (51): 36616-36622.
- Olivera, A, Lamas, S, Rodriguez-Puyol, D, and Lopez-Novoa, JM (1989). Adenosine induces mesangial cell contraction by an A1-type receptor. *Kidney Int*, **35** (6): 1300-1305.
- Olivera, A, and Spiegel, S (1993). Sphingosine 1 phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, **365** (6446): 557-560.
- Olivera, A, Kohama, T, Tu, Z, Milstien, S, and Spiegel, S (1998). Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J Biol Chem*, **273** (20): 12576-12583.
- Olivera, T, and Spiegel, S (2001). Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **64** (1-4): 123-134.
- Olsson, RA, and Pearson, JD (1990). Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev*, **70** (3): 761-845.
- Ongini, E, and Fredholm, BB (1996). Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **17** (10): 364-372.
- Oshimi, Y, Miyazaki, S, and Oda, S (1999). ATP-induced Ca²⁺ response mediated by P2U and P2Y purinoceptors in human macrophages: signalling from dying cells to macrophages. *Immunology*, **98** (2): 220-227.
- Ostrom, RS, Gregorian, C, and Insel, PA (2000). Cellular release of and response to ATP as key determinants of the set-point of signal transduction. *J Biol Chem*, **275** (16): 11735-11739.
- Pahan, K, Sheikh, FG, Khan, M, Namboodiri, AM, and Singh, I (1998). Sphingomyelinase and ceramide stimulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. *J Biol Chem*, **273** (5): 2591-2600.
- Palmer, TM, Gettys, TW, and Stiles, GL (1995). Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J Biol Chem*, **270** (28): 16895-16902.
- Palmer, TM, and Stiles, GL (1995). Adenosine receptors. *Neuropharmacology*, **34** (7): 683-694.
- Patel, V, Brown, C, Goodwin, A, Wilkie, N, and Boarder, MR (1996). Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production. *Biochem J*, **320** (Pt 1): 221-226.
- Paugh, SW, Payne, SG, Barbour, SE, Milstien, S, and Spiegel, S (2003). The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett*, **554** (1-2): 189-193.
- Pavenstädt, H, Gloy, J, Leipziger, J, Klaer, B, Pfeilschifter, J, Schollmeyer, P and Greger, R (1993). Effect of extracellular ATP on contraction, cytosolic calcium activity, membrane voltage and ion currents of rat mesangial cells in primary culture. *Br J Pharmacol*, **109** (4): 953-959.
- Pchejetski, D, Golzio, M, Bonhoure, E, Calvet, C, Doumerc, N, Garcia, V, Mazerolles, C, Rischmann, P, Teissié, J, Malavaud, B, and Cuvillier, O (2005). Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res*, **65** (24): 11667-11675.

- Pearson, WR (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol*, **183**: 63-89.
- Pébay, A, Toutant, M, Premont, J, Calvo, CF, Venance, L, Cordier, J, Glowinski, J, and Tence, M (2001). Sphingosine-1-phosphate induces proliferation of astrocytes: regulation by intracellular signalling cascades. *Eur J Neurosci*, **13** (12): 2067-2076.
- Pena, LA, Fuks, Z, and Kolesnick, R (1997). Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. *Biochem Pharmacol*, **53** (5): 615-621.
- Perry, DK, and Hannun, YA (1998). The role of ceramide in cell signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1436** (1-2): 233-243.
- Pettus, BJ, Chalfant, CE, and Hannun, YA (2002). Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta*, **1585** (2-3): 114-125.
- Pfeilschifter, J (1990). Extracellular ATP stimulates polyphosphoinositide hydrolysis and prostaglandin synthesis in rat renal mesangial cells. Involvement of pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding protein and feedback inhibition by protein kinase C. *Cell Signal*, **2** (2): 129-138.
- Pfeilschifter, J (1990). Comparison of extracellular ATP and UTP signalling in rat renal mesangial cells. No indications for the involvement of separate purino- and pyrimidino-receptors. *Biochem J*, **272** (2): 469-472.
- Pfeilschifter, J, Kunz, D, and Mühl, H (1993). Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells. *Nephron*, **64** (4): 518-525.
- Pfeilschifter, J, and Merriweather, C (1993). Extracellular ATP and UTP activation of phospholipase D is mediated by protein kinase C- ϵ in rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol*, **110** (2): 847-853.
- Pfeilschifter, J, and Huwiler, A (1996). Regulatory functions of protein kinase C isoenzymes in purinoceptor signalling in mesangial cells. *J Auton Pharmacol*, **16** (6): 315-318.
- Pfeilschifter, J (1994). Mesangial cells orchestrate inflammation in the renal glomerulus. *News Physiol Sci*, **9** (6): 271-276.
- Pillois, X, Chaulet, H, Belloc, I, Dupuch, F, Desgranges, C, and Gadeau, AP (2002). Nucleotide receptors involved in UTP-induced rat arterial smooth muscle cell migration. *Circ Res*, **90** (6): 678-681.
- Piomelli, D (1993). Arachidonic acid in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **5** (2): 274-280.
- Pitson, SM, D'Andrea, RJ, Vandeleur, L, Moretti, PA, Xia, P, Gamble, RJ, Vadas, MA, and Wattenberg, BW (2000). Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochem J*, **350** (Pt 2): 429-441.
- Pitson, SM, Moretti, PA, Zebol, JR, Xia, P, Gamble, JR, Vadas, MA, D'Andrea, RJ, and Wattenberg, BW (2000). Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase. *J Biol Chem*, **275** (43): 33945-33950.
- Pitson, SM, Moretti, PA, Zebol, JR, Zareie, R, Derian, CK, Darrow, AL, Qi, J, D'Andrea, RJ, Bagley, CJ, Vadas, MA, and Wattenberg, BW (2002). The nucleotide-binding site of human sphingosine kinase 1. *J Biol Chem*, **277** (51): 49545-49553.
- Pitson, SM, Moretti, PA, Zebol, JR, Lynn, HE, Xia, P, Vadas, MA, and Wattenberg, BW (2003). Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J*, **22** (20): 5491-5500.
- Pitson, SM, Xia, P, Leclercq, TM, Moretti, PA, Zebol, JR, Lynn, HE, Wattenberg, BW, and Vadas MA (2005). Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med*, **201** (1): 49-54.

- Prieschl, EE, Csonga, R, Novotny, V, Kikuchi, GE, and Baumruker, T (1999). The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after Fc epsilon receptor I triggering. *J. Exp. Med*, **190** (1): 1–8.
- Purkiss, JR, and Boarder, MR (1992). Stimulation of phosphatidate synthesis in endothelial cells in response to P2-receptor activation: Evidence for phospholipase C and phospholipase D involvement, phosphatidate and diacylglycerol interconversion and the role of protein kinase C. *Biochem J*, **287** (Pt 1): 31–36.
- Putney, JW jr., and Ribeiro, CM (2000). Signaling pathways between the plasma membrane and the endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell Mol Life Sci*, **57** (8-9): 1272-1286.
- Pyne, S and Pyne, NJ (2000). Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J*, **349** (Pt 2): 385-402.
- Ralevic, V, and Burnstock, G (1991). Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation*, **84** (1): 1–14.
- Ralevic V, and Burnstock, G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, **50** (3): 413–492.
- Rameh, LE, and Cantley, LC (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem*, **274** (13): 8347-8350.
- Ramkumar, V, Stiles, GL, Beaven, MA, and Ali, H (1993). The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J Biol Chem*, **268** (23): 16887–16890.
- Ramoz, N, Rueda, LA, Bouadjar, B, Favre, M, and Orth, G (1999). A susceptibility locus for epidermodysplasia verruciformis, an abnormal predisposition to infection with the oncogenic human papillomavirus type 5, maps to chromosome 17qter in a region containing a psoriasis locus. *J Invest Dermatol*, **112** (3): 259–263.
- Reisin, IL, Prat, AG, Abraham, EH, Amara, JF, Gregory, RJ, Ausiello, DA, and Cantiello, HF (1994). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem*, **269** (32): 20584-20591.
- Remmers, EF, Longman, RE, Du, Y, O'Hare, A, Cannon, GW, Griffiths, MM, and Wilder, RL (1996). A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats. *Nat Genet*, **14** (1): 82–85.
- Remuzzi, G, and Bertani, T (1998). Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med*, **339** (20): 1448-1456.
- Renault, AD, Starz-Gaiano, M, and Lehmann, R (2002). Metabolism of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid: a genome wide analysis of gene expression in Drosophila. *Mech Dev*, **119**: (Suppl. 1): S293-S301.
- Rhee, SG, Suh, PG, Ryu, SH, and Lee, SY (1989). Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science*, **244** (4904): 546-550.
- Riboni, L, Prinetti, A, Bassi, R, Caminiti, A, and Tettamanti, G (1995). A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma Neuro2a cell differentiation. *J Biol Chem*, **270** (45): 26868-26875.
- Riboni, L, Viani, P, Bassi, R, Prinetti, A, and Tettamanti, G (1997). The role of sphingolipid in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res*, **36** (2-3): 153-195.
- Rice, WR, Burton, FM, and Fiedeldej, DT (1995). Cloning and expression of the alveolar Type II cell P2U-purinergic receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **12** (1): 27–32.
- Robaye, B, Boeynaems, J-M, and Communi, D (1997). Slow desensitization of the human P2Y6 receptor. *Eur J Pharmacol*, **329** (2-3): 231–236.

- Romiti, E, Meacci, E, Tani, M, Nuti, F, Farnararo, M, Ito, M, and Bruni, P, (2000). Neutral/alkaline and acid ceramidase activities are actively released by murine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **275** (1-2): 746-751.
- Romiti, E, Vasta, V, Meacci, E, Farnararo, M, Linke, T, Ferlinz, K, Sandoff, K, and Bruni, P, (2000). Characterization of sphingomyelinase activity released by thrombin-stimulated platelets. *Mol Cell Biochem*, **205** (1-2): 75-81.
- Rosenfeldt, HM, Hobson, JP, Milstien, S, and Spiegel, S (2001). The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility. *Biochem Soc Trans* **29** (Pt 6): 836-839.
- Rossi, L, Manfredini, R, Bertolini, F, Ferrari, D, Fogli, M, Zini, R, Salati, S, Salvestrini, V, Gulinelli, S, Adinolfi, E, Ferrari, S, Di Virgilio, F, Baccarani, M, and Lemoli, RM (2007). The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood*, **109** (2): 533-542.
- Rost, S, Daniel, C, Schulze-Lohoff, E, Baumert, HG, Lambrecht, G, and Hugo, C (2002). P2 receptor antagonist PPADS inhibits mesangial cell proliferation in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int*, **62** (5): 1659-1671.
- Roviezzo, F, Del Galdo, F, Abbate, G, Bucci, M, D'Agosino, B, Antunes, E, De Dominicis, G, Parente, L, Rossi, F, Cirino, G, and De Palma, R (2004). Human eosinophil chemotaxis and selective in vivo recruitment by sphingosine 1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101** (30): 11170-11175.
- Russell, DG (2001). Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2** (8): 569-577.
- Sackin, H (1995). Stretch-activated ion channels. *Kidney Int*, **48** (4):1134-1147.
- Sackin, H (1995). Mechanosensitive channels. *Annu Rev Physiol*, 1995;**57** :333-53.
- Sadahira, Y, Yoshino, T, and Kojima, N (1994). B16 melanoma cell spreading on activated endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **30A** (10): 648-650.
- Sadahira, Y, Zheng, M, Ruan, F, Hakomori, S, and Igarashi, Y (1994). Sphingosine-1-phosphate inhibits extracellular matrix protein-induced haptotactic motility but not adhesion of B16 mouse melanoma cells. *FEBS Lett*, **340** (1-2): 99-103.
- Saiki, RK, Walsh, PS, Levenson, CH, and Ehrlich, HA (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86** (16): 6230-6234.
- Sakakura, C, Sweeney, EA, Shirahama, T, Hagiwara, A, Yamaguchi, T, Takahashi, T, Hakamori, S, and Igarashi, Y (1998). Selectivity of sphingosine-induced apoptosis. Lack of activity of DL-erythro-dihydrosphingosine. *Biochem Biophys Res Commun*, **246** (3): 827-830.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, and Maniatis, T (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Second Edition 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanches, G, de Alencar, LS, and Ventura, ALM (2002). ATP induces proliferation of retinal cell in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. *Int J Devl Neuroscience*, **20** (1): 21-27.
- Sanchez T, and Hla T (2004). Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem*, **92** (5): 913-922.
- Sandhoff, K, and Kolter, T (1997). Biochemistry of glycosphingolipid degradation. *Clin Chim Acta*, **266** (1): 51-61.
- Sanger, F, Nicklen, S, and Coulson, AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74** (12): 5463-5467.

- Sarkar, S, Maceyka, M, Hait, NC, Paugh, SW, Sankala, H, Mitstien, S, and Spiegel, S (2005). Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett*, **579** (24): 5313-5317.
- Schachter, JB, Li, Q, Boyer, JL, Nicholas, RA, and Harden, TK (1996). Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y1-purinoreceptor. *Br J Pharmacol*, **118** (1): 167-73.
- Schäfer, R, Sedehizade, F, Welte, T, and Reiser, G (2003). ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **285** (2): 376-385.
- Schlöndorff, D (1996). Roles of the mesangium in glomerular function. *Kidney Int*, **49** (6): 1583-1585.
- Schulze-Lohoff, E, Zanner, S, Ogilvie, A, and Sterzel, RB (1992). Extracellular ATP stimulates proliferation of cultured mesangial cells via P2-purinergic receptors. *Am J Physiol*, **263** (3 Pt 2): F374–F383.
- Schulze-Lohoff, E, Bitzer, M, Ogilvie, A, and Sterzel, RB (1995). P2U-purinergic receptor activation mediates inhibition of cAMP accumulation in cultured renal mesangial cells. *Renal Physiol Biochem*, **18** (5): 219–230.
- Schwiebert, EM, and Kishore, BK (2001). Extracellular nucleotide signaling along the renal epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, **280** (6): F945–F963.
- Schwiebert, LM, Rice, WC, Kudlow, BA, Taylor, AL, and Schwiebert, EM (2002). Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282** (2): C289-301.
- Sebastianò, AM, and Ribeiro, JA (1996). Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol*, **48** (3): 167–189.
- Seifert, R, and Schultz, G (1989). Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. *Trends Pharmacol Sci*, **10** (9): 365–369.
- Selzner, M, Bielawska, A, Morse, MA, Rüdiger, HA, Sindram, D, Hannun, YA, and Clavien, PA (2001). Induction of apoptotic cell death and Prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res*, **61** (3): 1233-1240.
- Shu, X, Wu, W, Mosteller, RD, and Broek, D (2002). Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*, **22** (22): 7758–7768.
- Sipma, H, Den Hertog, A, and Nelemans, A (1994). The phospholipase C activating P2U purinoreceptor also inhibits cyclic AMP formation in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, **268** (3): 431–437.
- Skulachev, VP (2001). The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology. *Exp Gerontol*, **36** (7): 995-1024.
- Sobue, S, Hagiwara, K, Banno, Y, Tamiya-Koizumi, K, Suzuki, M, Tkagi, A, Kojima, T, Asano, H, Nozawa, Y, and Murate, T (2005). Transcription factor specificity protein 1 (Sp1) is the main regulator of nerve growth factor-induced sphingosine kinase 1 gene expression of the rat pheochromocytoma cell line, PC12. *J Neurochem*, **95** (4): 940-949.
- Solini, A, Santini, E, Chimenti, D, Chiozzi, P, Pratesi, F, Cuccato, S, Falzoni, S, Lupi, R, Ferrannini, E, Pugliese, G, and Di Virgilio, F (2007). Multiple P2X receptors are involved in the modulation of apoptosis in human mesangial cells: evidence for a role of P2X4. *Am J Physiol Renal Physiol* Jan 30 Epub ahead of print.

- Sörensen, CE, and Novak, I (2001). Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J Biol Chem*, **276** (35): 32925-32932.
- Soto, F, Garcia-Guzman, M, Gomez-Hernandez, JM, Hollmann, M, Karschin, C, and Stühmer, P (1996a). P2X4: An ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93** (8): 3684–3688.
- Spiegel, S, Foster, D, and Kolesnick, R (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol*, **8** (2): 159-167.
- Spiegel, S, and Merrill, AH jr. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J*, **10** (12): 1388-1397.
- Spiegel, S, Cuvillier, O, Edsall, LC, Kohama, T, Menzeleev, R, Olah, Z, Olivera, A, Pirianov, G, Thomas, DM, Tu, Z, Van Brocklyn, JR, and Wang, F (1998). Sphingosine-1-phosphate in cell growth and cell death. *Ann N Y Acad Sci*, **845**: 11-18.
- Spiegel, S, and Milstien, S (2000). Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett*, **476** (1-2): 55-57.
- Spiegel S, and Milstien, S (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4** (5): 397–407.
- Spiegel S, and Milstien, S (2003). Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways. *Biochem Soc Trans*, **31** (Pt 6): 1216–1219.
- Stam, NJ, Klomp, J, Van de Heuvel, N, and Olijve, W (1996). Molecular cloning and characterization of a novel orphan receptor (P2P) expressed in human pancreas that shows high structural homology to the P2U purinoceptor. *FEBS Lett*, **384** (3): 260-264.
- Sterzel, RB, Schulze-Lohoff, E, Weber, M, and Goodman, SL (1992). Interactions between glomerular mesangial cells, cytokines and extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol*, **2** (10 Suppl.): 126-131.
- Stone, TW (1991). Adenosine in the nervous system, Academic Press, London.
- Stout, CE, Constantin, JL, Naus, CC, and Charles, AC (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem*, **277** (12): 10482-10488.
- Subbaramaiah, K, Telang, N, Ramonetti, JT, Araki, R, DeVito, B, Weksler, BB, and Dannenberg, AJ (1996). Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res*, **56** (19): 4424-4429.
- Sugita, M, Dulaney, JT, and Moser, HW (1972). Ceramidase deficiency in Farber's disease (lipogranulomatosis). *Science*, **178** (65): 1100-1102.
- Surprenant, A (1996) Functional properties of native and cloned P2X receptors, in *P2 Purinoceptors: Localization, Function and Transduction Mechanisms* (Chadwick DJ and Goode JA eds) 208–222, John Wiley & Sons, Chichester.
- Surprenant, A, Rassendren, FA, Kawashima, E, North, RA, and Buell, G (1996), The cytolytic P2z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, **272** (5262): 735–738.
- Sweeney, EA, Inokuchi, J, and Igarashi, Y (1998). Inhibition of sphingolipid induced apoptosis by caspase inhibitors indicates that sphingosine acts in an earlier part of the apoptotic pathway than ceramide. *FEBS Lett*, **425** (1): 61-65
- Taha, TA, Osta, W, Kozhaya, L, Bielawski, J, Johnson, KR, Gillanders, WE, Dbaibo, GS, Hannun, YA, and Obeid, LM (2004). Down-regulation of sphingosine kinase-1 by DNA damage: dependence on proteases and p53. *J Biol Chem*, **279** (19): 20546–20554.

- Takeda, M, Kawamura, T, Kobayashi, M, and Endou, H (1996). ATP-induced calcium mobilization in glomerular mesangial cells is mediated by P2U purinoceptor. *Biochem Mol Biol Int*, **39** (6): 1193–1200.
- Takuwa, Y (2002). Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1582** (1-3): 112-120.
- Tani, M, Okino, N, Mori, K, Tanigawa, T, Izu, H, and Ito, M (2000). Molecular cloning of the full-length cDNA encoding mouse neutral ceramidase. A novel but highly conserved gene family of neutral/alkaline ceramidases. *J Biol Chem*, **275** (15): 11229-11234.
- Tomfohrde, J, Silverman, A, Barnes, R, Fernandez-Vina, MA, Young, M, Lory, D, Morris, L, Wuepper, KD, Stastny, P, Menter, A, and Bowcock, A. (1994). Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science*, **264** (5162): 1141–1145.
- Topham, MK, and Prescott, SM (1999). Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J Biol Chem*, **274** (17): 11447-11450.
- Tu, MT, Luo, SF, Wang, CC, Chien, CS, Chiu, CT, Lin, CC, and Yang, CM (2000). P2Y(2) receptor-mediated proliferation of C(6) glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol*, **129** (7): 1481-1489.
- Thudichum, JLW (1884). A treatise on the chemical constitution of the brain. London, Bailliere, Tindall and Cox.
- Uchida, Y, Murata, S, Schmith, M, Behne, MJ, Lee, JD, Ichikawa, S, Elias, PM, Hirabayashi, Y, and Holleran, WM (2002). Glucosylceramide synthesis and synthase expression protect against ceramide-induced stress. *J Lipid Res*, **43** (8): 1293-1302.
- Valera, S, Hussy, N, Evans, RJ, Adami, N, North, RA, Surprenant, A and Buell, G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature*, **371** (6497): 516–519.
- Van Brocklyn, J, Letterle, C, Snyder, P, and Prior, T (2002). Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through Gi-coupled receptors: role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase beta. *Cancer Lett*, **181** (2): 195-204.
- Van Brocklyn, JR, Young, N, and Roof, R (2003). Sphingosine-1-phosphate stimulates motility and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett*, **199** (1): 53-60.
- Van Brocklyn, JR, Jackson, CA, Pearl, DK, Kotur, MS, Snyder, PJ, and Prior, TW (2005). Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64** (8): 695-705.
- Van Calker, D, Müller M, and Hamprecht, B (1978). Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature*, **276** (5690): 839–841.
- Vanhaesebroeck, B, and Alessi, DR (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*, **346** (Pt 3): 561-576.
- Van Veldhoven, PP, and Mannaerts, GP (1993). Sphingosine-phosphate lyase. *Adv Lipid Res*, **26**: 69-98.
- Venkataraman, K, Thangada, S, Michaud, J, Oo, ML, Ai, Y, Lee, YM, Wu, M, Parikh, NS, Khan, F, Proia, RL, and Hla, T (2006). Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. *Biochem J*, **397** (3): 461-71.
- Verghese, MW, Kneisler, TB, and Boucheron, JA (1996). P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL60 cells. *J Biol Chem*, **271** (26): 15597–15601.

- Walker, BAM, Rocchini, C, Boone, RH, Ip, S, and Jacobson, MA (1996). Adenosine A2a receptor activation delays apoptosis in human neutrophils. *J Immunol*, **158**: 2926–2931.
- Wang, M, Kong, Q, Gonzalez, FA, Sun, G, Erb, L, Seye, C, and Weisman, GA (2005). P2Y nucleotide receptor interaction with alpha integrin mediates astrocyte migration. *J Neurochem*, **95** (3): 630-40.
- Webb, TE, Simon, J, Krishek, BJ, Bateson, AN, Smart, TG, King, BF, Burnstock, G, and Barnard, EA (1993). Cloning and functional expression of a brain G-proteincoupled ATP receptor. *FEBS Lett*, **324** (2): 219–225.
- Webb, TE, King, BF, Burnstock, G, and Barnard, EA (1995). Cloning and expression of a novel P2 purinoceptor: P2Y3. *FEBS Abstracts*, **21**: P27.
- Webb, TE, Henderson, D, King, BF, Wang, S, Simon, J, Bateson, AN, Burnstock, G, and Barnard EA (1996). A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y3) activated preferentially by nucleoside diphosphates. *Mol Pharmacol*, **50** (2): 258–265.
- Webb, TE, Feolde, E, Vigne, P, Neary, JT, Runberg, A, Frelin, C, and Barnard, EA (1996). The P2Y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylate cyclase. *Br J Pharmacol*, **119** (7): 1385–1392.
- Wehner, R, and Gehring, W (1995). Zoologie. 23. neu überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Welsch, U and Sobotta, J (2006). Lehrbuch Histologie. 2. Auflage, Nachdruck 2006. Urban & Fischer Verlag, München.
- Wendler, CC, and Rivkees, SA (2006). Sphingosine-1-phosphate inhibits cell migration and endothelial to mesenchymal cell transformation during cardiac development. *Dev Biol*, **291** (2): 264-277.
- Wiegandt, H (1985). The chemical constitution of gangliosides of the vertebrate nervous system. *Behav Brain Res*, **66** (1-2): 85-97.
- Wiesner, DA, Kilkus, JP, Gottschalk, AR, Quintans, J, and Dawson, G (1997). Anti-immunoglobulin-induced apoptosis in WEHI 231 cells involves the slow formation of ceramide from sphingomyelin and is blocked by bcl-XL. *J Biol Chem*, **272** (15): 9868-9876.
- Wiesner, DA, and Dawson, G (1996). Programmed cell death in neurotumour cells involves the generation of ceramide. *Glycoconj J*, **13** (2): 327-333.
- Xu, R, Jin, J, Hu, W, Sun, W, Bielawski, J, Szulc, Z, Taha, T, Obeid, LM, and Mao, C (2006). Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J*, **20** (11): 1813-1825.
- Yakel, JL, Warren, RA, Reppert, SM and North, RA (1993). Functional expression of adenosine A2b receptor in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol*, **43** (2): 277–280.
- Yamada, K, Sakane, F, Imai, S, and Takemura, H (1993). Sphingosine activates cellular diacylglycerol kinase in intact Jurkat cells, a human T-cell line. *Biochim Biophys Acta*, **1169** (3): 217-224.
- Yamagata, K, Tagami, M, Torii, Y, Takenaga, F, Tsumagari, S, Itoh, S, Yamori, Y, and Nara, Y (2003). Sphingosine 1-phosphate induces the production of glial cell line-derived neurotrophic factor and cellular proliferation in astrocytes. *Glia*, **41** (2): 199-206.
- Yamaguchi, H, Kitayama, J, Takuwa, N, Arikawa, K, Inoki, I, Takehara, K, Nagawa, H, and Takuwa, Y (2003). Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells. *Biochem J*, **374** (Pt 3): 715-722.
- Yamashita, H, Kitayama, J, Shida, D, Yamaguchi, H, Mori, K, Osada, M, Aoki, S, Yatomi, Y, Takuwa, Y, and Nagawa, H (2005). Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile in human gastric cancer cells: differential regulation on the migration and proliferation. *J Surg Res*, **130** (1): 80-87.

- Yang, S, Cheek, DJ, Westfall, DP and Buxton, IL (1994). Purinergic axis in cardiac blood vessels: Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. *Circ Res*, **74** (3): 401–407.
- Yatomi, Y, Yamamura, S, Ruan, F, Kume, S, Ozaki, Y, and Igarashi, Y (1997). N,N-dimethylsphingosine 1-phosphate activates human platelets. *FEBS Lett*, **417** (3): 341-344.
- Yoshimura, Y, Okino, N, Tani, M, and Ito, M (2001). Molecular cloning and characterization of a secretory neutral ceramidase of *Drosophila melanogaster*. *J Biochem*, **132** (2): 229-236.
- Yoshimura, Y, Tani, M, Okino, N, Iida, H, and Ito, M (2004). Molecular cloning and functional analysis of zebrafish neutral ceramidase. *J Biol Chem*, **279** (42): 44012-44022.
- Zemann, B, Kinzel, B, Müller, M, Reuschel, R, Mechtcheriakova, D, Urtz, N, Bornancin, F, Baumruker, T, and Billich, A (2006). Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood*, **107** (4): 1454-1458.
- Zhang, Y, Palmblad, J, and Fredholm, BB (1996). Biphasic effect of ATP on neutrophil functions mediated by P2U and adenosine A2A receptors. *Biochem Pharmacol*, **51** (7): 957–965.
- Zhang, Z, Mandal, AK, Mital, A, Popescu, N, Zimonjic, D, Moser, A, Moser, H, and Mukherjee, AB (2000). Human acid ceramidase gene: novel mutations in Farber disease. *Mol Genet Metab*, **70** (4): 301-309.
- Ziyal, R, Ziganshin, AU, Nickel, P, Ardanuy, U, Mutschler, E, Lambrecht, G, and Burnstock, G (1997) Vasoconstrictor responses via P2X-receptors are selectively antagonized by NF023 in rabbit isolated aorta and saphenous artery. *Br J Pharmacol*, **120** (5): 954–960.
- Zundel, W, Swiersz, LM; and Giaccia, A (2000). Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol*, **20** (5): 1507-1514.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1: Niere des Menschen und Nierenkörperchen (Malpighi-Körperchen)	2
Abb. 2: Funktion und Struktur des Mesangiums	4
Abb. 3: Chemische Struktur einiger ausgewählter Sphingolipide	7
Abb. 4: Biosynthesewege der Sphingolipide	8
Abb. 5: Zelluläre Topologie der Biosynthese, Degradation und der Signaltransduktion der Sphingolipide	9
Abb. 6: Überblick über die durch Sphingolipide hervorgerufenen zellulären Antworten	10
Abb. 7: Sequenzvergleich einiger Sphingosinkinasen vom Typ 1	14
Abb. 8: Sequenzvergleich einiger Sphingosinkinasen vom Typ 2	16
Abb. 9: Effekt extrazellulär applizierter Nukleotide auf die Aktivität von rSPHK 1 und rSPHK 2	50
Abb. 10: Effekt extrazellulär applizierter Nukleotide auf die Aktivität von rASAH 2	51
Abb. 11: Veränderung der Proteinexpression und Erhöhung der Aktivität der rSPHK 1 durch ATP	52
Abb. 12: Veränderung der Proteinexpression der rSPHK 1 durch ATP	53
Abb. 13: Wirkung von UTP auf die Proteinexpression und Aktivität der rSPHK 1	54
Abb. 14: Erhöhung der Aktivität der rSPHK 1 nach Kurzzeitstimulation	55
Abb. 15: Effekt von Suramin auf die rSPHK 1-Aktivität	56
Abb. 16: Effekt von Pertussistoxin auf die rSPHK 1-Aktivität	57
Abb. 17: Effekt von MAPK- und PKC-Inhibitoren auf die rSPHK 1-Aktivität	58
Abb. 18: Induktion der Transkription der <i>rSPHK 1</i> -mRNA durch ATP	59
Abb. 19: Untersuchung zur mRNA-Stabilität der <i>rSPHK 1</i> -mRNA	60
Abb. 20: Induktion der Transkription der <i>rSPHK 1</i> -mRNA durch UTP	61
Abb. 21: Untersuchung zur mRNA-Stabilität der <i>rSPHK 1</i> -mRNA	62
Abb. 22: Gen- und Promotorstruktur der <i>rSPHK 1</i>	63
Abb. 23: Effekt von ATP und UTP auf die Migration von Mesangiumzellen	65
Abb. 24: Zeitkinetik der Migration und Untersuchung der Chemotaxis von Mesangiumzellen	66
Abb. 25: Nachweis der Funktionalität einiger verwendeten siRNAs	67
Abb. 26: Einfluss der Depletion der Sphingosinkinase 1 oder 2 auf die durch extrazelluläre Nukleotide induzierte Migration von Mesangiumzellen	67
Abb. 27: Nachweis der Depletion der neutralen Ceramidase, sowie Einfluss der Depletion auf die durch extrazelluläre Nukleotide induzierte Migration von Mesangiumzellen	68
Abb. 28: Nachweis der Depletion der mSPHK 1 in Mausmesangiumzellen	69
Abb. 29: Effekt von ATP und UTP auf die Migration verschiedener Mausmesangiumzelllinien	70
Abb. 30: Einfluss von S1P auf die Migration von Mesangiumzellen	71
Abb. 31: Einfluss von MAPK- und PKC-Inhibitoren sowie Cycloheximid auf die durch ATP und UTP induzierte Migration von Mesangiumzellen	72
Abb. 32: Wirkung von ATP und UTP auf die Proliferation von Mesangiumzellen	73

<u>Abb. 33:</u> Wirkung der Depletion der Sphingosinkinasen 1 und 2 durch siRNA auf die durch ATP und UTP induzierte Proliferation von Mesangiumzellen	74
<u>Abb. 34:</u> Wirkung der Depletion neutralen Ceramidase durch siRNA auf die durch ATP und UTP induzierte Proliferation von Mesangiumzellen	75
<u>Abb. 35:</u> Wirkung von Sphingosin-1-Phosphat auf die Proliferation von Mesangiumzellen	76
<u>Abb. 36:</u> Mögliche Phosphorylierungsstellen der Sphingosinkinase 1 der Ratte (rSPHK 1)	78

7.2 Tabellenverzeichnis

<u>Tab. 1:</u> Transfektion mit Oligofectamine™-Reagenz	22
<u>Tab. 2:</u> Transfektion mit LipofectAMINE PLUS™ Reagenz	22
<u>Tab. 3:</u> Transfektion mit Effectene™-Transfektionsreagenz	23

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur mit den angegebenen Mitteln angefertigt habe.

Mainz, im April 2007

Sabine Klawitter

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sabine Maria Klawitter
Geburtsdatum: 19.02.1979
Geburtsort: Pirmasens
Anschrift: Charlottenstr. 14, 66955 Pirmasens
Am Fort Elisabeth 15, 55131 Mainz

Schulbildung:

1985-1989 Robert-Schuman-Grundschule, Pirmasens
1989-1998 Immanuel-Kant-Gymnasium, Pirmasens

Studium und Promotion

Wintersemester 1998 Immatrikulation an der Johannes-Gutenberg
Universität Mainz; Studiengang Biologie
Wintersemester 2000 Vordiplom im Studiengang Biologie
Wintersemester 2003 Diplom im Studiengang Biologie; Abschluß mit Note 1
(sehr gut)
Januar 2004 – Juni 2007 Dissertation am Institut für Allgemeine Pharmakologie
und Toxikologie (Direktor: Prof. Dr. J. Pfeilschifter) des
Klinikums der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt/Main unter der Betreuung von Prof. Dr. A.
Huwiler
Thema: „Regulation der Sphingosinkinase 1 und 2
und der neutralen Ceramidase in Mesangiumzellen
der Ratte“

Vorträge

Klawitter, S, Pfeilschifter, J, and Huwiler, A.
Extracellular nucleotides upregulate sphingosine kinase-1 expression and
activity in renal mesangial cells.
47. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz (2006). *N-S Arch Pharmacol.* **372**
(Suppl. 7): 19-20.

Posterpräsentationen

Klawitter, S, Hofmann, LP, Pfeilschifter, J, and Huwiler, A
Extracellular nucleotides induce migration of renal mesangial cells by
upregulating sphingosine kinase 1 expression and activity
Basel Computational Biology Conference (USGEB) 2007. Konferenzbroschüre

Publikationen

Burmester, T, Storf, J, Hasenjäger, A, **Klawitter, S**, and Hankeln, T (2006).
The hemoglobin genes of *Drosophila*.
FEBS J; **273**(3):468-80.

Huwiler, A, Döll, F, Ren, S, **Klawitter, S**, Greening, A, Römer, I, Bubnova, S, Reinsberg, L, and Pfeilschifter, J (2006).
Histamine increases sphingosine kinase-1 expression and activity in the human arterial endothelial cell line EA.hy 926 by a PKC-alpha-dependent mechanism.
Biochim Biophys Acta; **1761**(3):367-76.

Hankeln, T, **Klawitter, S**, Krämer, M, and Burmester, T (2006).
Molecular characterization of hemoglobin from the honeybee *Apis mellifera*.
J Insect Physiol; **52**(7):701-10.

Klawitter, S, Hofmann, LP, Pfeilschifter, J and Huwiler, A (2007).
Extracellular nucleotides induce migration of renal mesangial cells by upregulating sphingosine kinase-1 expression and activity.
Br J Pharmacol; **150**(3):271-80.

Burmester, T, **Klawitter, S**, and Hankeln, T (2007).
Characterization of two globin genes from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: Divergent origin of nematoceran haemoglobins.
Insect Mol Biol; **16**(2): 133-42.