

# **Funktionelle Rolle und subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen 1 und 2 in HEK-293- und PC12-Zellen**

Kerstin Danneberg

Sphingosinkinasen (SphK) katalysieren die Phosphorylierung von Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P). S1P aktiviert einerseits spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), andererseits spielt es eine Rolle als intrazellulärer second messenger bei der Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern. Die intrazelluläre Bildung von S1P durch SphK wird durch verschiedene Agonisten reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation der SphK-Isoformen SphK1 und SphK2 und ihre funktionelle Rolle bei der Stimulation von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegen in HEK-293- und PC12-Zellen untersucht. Hierzu wurde eine neue Variante der SphK2 kloniert und zur Expression gebracht. Die starke Überexpression der SphK1 oder SphK2 führte in HEK-293-Zellen zu einer Hemmung der Agonist-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege, vermutlich wegen einer Verarmung der Zellen an Sphingosin. Dagegen verstärkte eine kleine Menge SphK1 die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege beispielsweise durch den  $\text{M}_3$ -Rezeptor. In PC12-Zellen führte die transiente oder stabile Überexpression der SphK1 zu einer deutlichen Verstärkung der durch KCl-Depolarisation induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege. Dieser Effekt spiegelte sich auch in einer Verstärkung der durch KCl induzierten Noradrenalin-Freisetzung wider. Die SphK1 spielt folglich eine Rolle bei der Verstärkung der durch Depolarisation ausgelösten Exozytose. Die Lokalisation der SphK-Isoformen wurde in lebenden Zellen mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Die SphK2 fand sich in HEK-293-Zellen trotz ihrer putativen transmembranären Domänen ausschliesslich im Cytosol und veränderte nach Stimulation der Zellen nicht ihre Lokalisation. Die SphK1 befand sich in HEK-293-Zellen hauptsächlich im Cytosol, nur ein kleiner Teil war an der Plasmamembran lokalisiert. Eine Stimulation des  $\text{M}_3$ -Rezeptors verursachte eine rasche Translokation der SphK1 vom Cytosol an die Plasmamembran. Diese Wirkung wurde auch nach Stimulation des  $\text{B}_2$ -Rezeptors beobachtet, jedoch nicht nach Stimulation von  $\text{M}_2$ -, S1P-, Thrombin-, EGF- oder PDGF-Rezeptoren. In PC12-Zellen hatte Bradykinin dagegen keinen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation der SphK1, die folglich Zelltyp-spezifisch war. Die durch den  $\text{M}_3$ -Rezeptor induzierte SphK1-Translokation war unabhängig von einem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, einer Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, einer PKC-Aktivierung, einer Tyrosinphosphorylierung, vom Aktin-Cytoskelett und von der katalytischen Aktivität der SphK1. Der Calmodulin-Inhibitor W7 verursachte eine Rückverlagerung von basal an der Membran gebundener SphK1 ins Cytosol und eine Verstärkung der cytosolischen SphK1-Aggregate, was für eine Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin bei der Membran-Assoziation der SphK1 spricht. W7 vermochte nicht die  $\text{M}_3$ -stimulierte SphK1-Translokation zu hemmen, was nahe legt, daß hier ein anderer Mechanismus zur Membran-Assoziation des Enzyms führte. Schließlich konnte gezeigt werden, daß die  $\text{M}_3$ -stimulierte SphK1-Translokation auf der Aktivierung von  $\text{G}\alpha_q$  beruhte und durch konstitutiv aktives  $\text{G}\alpha_q$  spezifisch imitiert werden konnte. Die Daten zeigen, daß die subzelluläre Lokalisation der SphK1 Zelltyp-spezifisch durch verschiedene Stimuli reguliert wird, und legen eine Rolle dieses Enzyms bei der lokalen Produktion von S1P in der Zelle nahe.