

Regulation zellulärer Funktionen durch Enzyme des Sphingosin-1-Phosphat-Metabolismus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches

Biologie und Geographie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Michael ter Braak

aus Oberhausen

April 2008

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. K. H. Jakobs

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. P. Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 13. August 2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungen	1
2.	Einleitung	4
2.1.	Sphingosin-1-Phosphat	4
2.2.	Sphingosinkinasen	6
2.3.	S1P-Rezeptoren	12
2.4.	S1P-Lyase	16
2.5.	Sphingosin-Analoga	19
2.6.	Fragestellung und Zielsetzung	20
3.	Material und Methoden	23
3.1.	Material	23
3.1.1.	Chemikalien	23
3.1.2.	Antikörper	24
3.1.3.	Restriktionsenzyme	24
3.1.4.	Sonstige Enzyme	24
3.1.5.	Vektoren	25
3.1.6.	Verwendete DNA-Konstrukte	25
3.1.7.	Antibiotika	26
3.1.8.	Oligonukleotide	26
3.1.9.	Verwendete Kits	26
3.1.10.	Molekulargewichts-/DNA-Standards	27
3.1.11.	Medien und Pufferlösungen	27
3.2.	Methoden	28
3.2.1.	Zellkultur	28
3.2.2.	Transfektion und Überprüfung der Transfektionseffizienz	29
3.2.3.	Nukleinsäure-Analysen	30
3.2.3.1.	Generierung und Klonierung von humanen SphK1-Fragmenten	30
3.2.3.2.	PCR und Aufreinigung von PCR-Produkten	31
3.2.3.3.	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	31
3.2.3.4.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	32
3.2.3.5.	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	32
3.2.3.6.	Ligation	32
3.2.3.7.	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	33
3.2.3.8.	Detektion positiver Klone und Plasmid-Präparationen	34

3.2.3.9.	DNA-Restriktion.....	35
3.2.3.10.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
3.2.3.11.	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	35
3.2.3.12.	Fällung von Nukleinsäuren.....	36
3.2.4.	Protein-Analysen.....	36
3.2.4.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	36
3.2.4.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot-Analyse.....	37
3.2.4.3.	Entfernung der Antikörper von Nitrocellulosemembranen.....	38
3.2.4.4.	Coimmunopräzipitation.....	39
3.2.4.5.	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	40
3.2.4.6.	Immunfluoreszenzfärbung.....	41
3.2.4.7.	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	42
3.2.5.	Statistische Datenauswertung und Präsentation.....	44
4.	Ergebnisse.....	45
4.1.	Mechanismus der durch den M ₃ -Rezeptor induzierten SphK1-Translokation in HEK-293-Zellen.....	45
4.1.1.	Subzelluläre Lokalisation und Translokation der humanen SphK1.....	45
4.1.2.	Vergleich der durch Carbachol induzierten Translokation der SphK1 mit der Translokation anderer Signalmoleküle.....	49
4.1.3.	Klonierung und Lokalisation von SphK1-Fragmenten.....	55
4.1.4.	Einfluss von konstitutiv aktivem G _{αq} auf die SphK1-Lokalisation.....	59
4.1.5.	Coimmunopräzipitation.....	60
4.2.	Funktionelle Bedeutung der G _q -stimulierten Translokation der SphK1 an die Plasmamembran in den M ₃ -Rezeptor stabil exprimierenden HEK-293-Zellen.....	64
4.2.1.	Lokalisation des S1P ₁ -Rezeptors vor und nach Stimulierung des M ₃ -Rezeptors.....	64
4.2.2.	Lokalisation der S1P ₂ - und S1P ₃ -Rezeptoren vor und nach Stimulierung des M ₃ -Rezeptors.....	66
4.2.3.	Rolle der katalytischen Aktivität der SphK1 bei der durch Carbachol induzierten S1P ₁ - Rezeptorinternalisierung.....	67
4.2.4.	Rolle der S1P ₁ -Rezeptoraktivierung bei der durch Carbachol induzierten S1P ₁ -Rezeptorinternalisierung.....	69
4.2.5.	Einfluss von VPC23019 auf die durch Carbachol induzierte S1P ₁ -Rezeptorinternalisierung.....	71
4.2.6.	Wirkung von konstitutiv aktivem G _{αq} auf die Lokalisation des S1P ₁ -Rezeptors.....	74
4.3.	Ca ²⁺ -Homöostase in <i>SGPL1</i> ^{-/-} -MEFs.....	75
4.3.1.	Basale [Ca ²⁺] _i und durch Agonisten induzierte [Ca ²⁺] _i -Anstiege.....	75
4.3.2.	Durch Thapsigargin induzierte [Ca ²⁺] _i -Anstiege.....	78
4.3.3.	Einfluss des SphK-Inhibitors SKI II auf die basale [Ca ²⁺] _i	81
4.3.4.	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der <i>SGPL1</i> ^{-/-} -MEFs.....	82
4.4.	Wirkung des Sphingosin-Analogons cis-4-MSph in HEK-293-Zellen.....	88

4.4.1.	Durch cis-4-MSph ausgelöste $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege.....	88
4.4.2.	Einfluss des cis-4-MSph auf die durch Agonisten induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege.....	90
4.4.3.	Einfluss des cis-4-MSph auf die Lokalisation der S1P-Rezeptoren.....	94
5.	Diskussion	96
5.1.	Mechanismus der durch Carbachol induzierten SphK1-Translokation.....	96
5.2.	Funktionelle Bedeutung der G_q -stimulierten Translokation der SphK1 an die Plasmamembran.....	101
5.3.	Ca^{2+} -Homöostase in <i>SGPL1</i> ^{-/-} -MEFs.....	105
5.4.	Zelluläre Wirkungen des Sphingosin-Analogons cis-4-MSph.....	108
6.	Zusammenfassung	112
7.	Literaturverzeichnis	115
8.	Anhang	132

1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre freie Calciumkonzentration
cis-4-MS1P	cis-4-Metylsphingosin-1-Phosphat
cis-4-MSph	cis-4-Methylsphingosin
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDG	<i>endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(ss-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular regulated kinases</i>
<i>et al.</i> ,	und andere
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FTY720-P	FTY720-Phosphat
G418	Geneticin
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser

HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HeBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HEK-293-Zellen	menschliche embryonale Leberzellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine N'-(2-Ethan sulfonische Säure)
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LPA	Lysophosphatidsäure
min	Minute
mM	millimol pro Liter
M	Mol pro Liter
M ₃ -Rezeptor	Muskarinrezeptor-Subtyp M ₃
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEFs	embryonale Mausfibroblasten
mol	6,3 x 10 ²³ Teilchen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PA	Phosphatidsäure
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
Pgp	<i>P-glycoprotein</i>
pH	-log ₁₀ [H ⁺]
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTX	Pertussis-Toxin
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNase A	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde

S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Calcium-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums
<i>SGPLI</i> ^{-/-} -MEFs	embryonale S1P-Lyase defiziente Mausfibroblasten
<i>SGPLI</i> ^{+/+} -MEFs	embryonale Wildtyp-Mausfibroblasten
SphK	Sphingosinkinase
<i>SPHK1</i> ^{-/-} -MEFs	embryonale SphK1 defiziente Mausfibroblasten
<i>SPHK1</i> ^{+/+} -MEFs	embryonale Wildtyp-Mausfibroblasten
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
THI	2-Acetyl-4-Tetrahydroxybutylimidazol
TLCK	Tosyl-Lysyl-Chloromethylketon
T _m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

2. Einleitung

2.1. Sphingosin-1-Phosphat

Das im menschlichen Organismus ubiquitär vorkommende, bioaktive Lysophospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) wurde lange Zeit lediglich als Zwischenprodukt des Sphingolipid-Metabolismus angesehen. Erst in den letzten zwei Jahrzehnten wurde die große Bedeutung des S1P in der Signaltransduktion und damit als Regulator einer Vielzahl zellulärer Prozesse erkannt. S1P spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Organisation des Cytoskeletts, Anti-Apoptose, Migration und Regulation der zellulären Calcium (Ca^{2+})-Homöostase (Goetzl *et al.*, 2004; Meyer zu Heringdorf, 2004; Pyne und Pyne, 2000; Spiegel und Milstien, 2002; 2003). Einerseits wirkt S1P intrazellulär als *second messenger* (Spiegel, 1999; Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003a), andererseits werden viele Wirkungen des S1P durch dessen Bindung an fünf spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt (Hla, 2003; Pyne und Pyne, 2002; Spiegel und Milstien, 2003; Fukushima *et al.*, 2001).

S1P wird durch die von Sphingosinkinasen (SphK) katalysierte Phosphorylierung von Sphingosin gebildet (Kohama *et al.*, 1998; Olivera und Spiegel, 2001). Sphingosin entsteht im Verlauf des Sphingolipid-Metabolismus durch den Abbau des über eine *de-novo* Synthese oder aus Sphingomyelin gebildeten Ceramids (Le Stunff *et al.*, 2004; Saba und Hla 2004). Der Abbau von S1P durch Dephosphorylierung zu Sphingosin erfolgt entweder durch Lipidphosphat-Phosphohydrolasen oder S1P-Phosphatasen (Mandala *et al.*, 2000; Pyne und Pyne 2002). Die S1P-Lyase katalysiert dagegen die irreversible und Pyridoxalphosphat-abhängige Spaltung der C2-C3-Bindung im S1P und bildet Hexadecanal und Phosphoethanolamin (Oskouian und Saba, 2007; Van Veldhoven, 2000). Alternativ zu der durch die SphK katalysierten S1P-Bildung kann S1P auch durch den durch Autotaxin katalysierten Abbau des S1P-Analogons Sphingosylphosphorylcholin gebildet werden (Clair *et al.*, 2003). Die physiologische Bedeutung dieser S1P-Produktion muss jedoch noch geklärt werden.

Die zelluläre Produktion von S1P ist streng reguliert. Die SphK regulieren zusammen mit den S1P-degradierenden Enzymen die intrazelluläre S1P-Konzentration. Im Ruhezustand resultiert dieses Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau des S1P in einer niedrigen intrazellulären S1P-Konzentration (Pyne und Pyne, 2000).

Obwohl die für die Bildung von S1P entscheidenden Enzyme in fast allen Geweben exprimiert werden, unterscheiden sich die S1P-Gehalte im Körper. Im peripheren Gewebe liegen S1P-Konzentrationen von 10-30 nM vor. Im Blut ist die S1P-Konzentration sehr viel höher und beträgt im Serum 400-900 nM (Okajima, 2002). Im Blutplasma beträgt die S1P-Konzentration dagegen 200-400 nM, wobei ein beträchtlicher Teil des S1P an Albumin und die Lipoproteine hoher Dichte gebunden ist (Okajima, 2002). Der vorherrschende Konzentrationsgradient zwischen dem lymphatischen Gewebe und dem Blut nimmt eine zentrale Bedeutung bei der Steuerung immunologischer Prozesse in Antwort auf S1P ein. S1P wird vor allem durch Thrombozyten gebildet und gespeichert, die eine hohe Aktivität der SphK aufweisen (Yatomi *et al.*, 1997; 2001). Aktivierte Thrombozyten sezernieren S1P, wahrscheinlich über zwei voneinander unabhängige Transporter, in die Blutbahn (Kobayashi *et al.*, 2006), wodurch migratorische und proliferative Effekte in epidermalen Zellen reguliert werden und der Wundheilungsprozess beeinflusst wird (Vogler *et al.*, 2003). Neben Thrombozyten sezernieren auch Erythrozyten, Mastzellen, Neutrophile und mononukleare Zellen kontinuierlich kleinere Mengen S1P und sind dadurch an der Aufrechterhaltung konstanter S1P-Plasmaspiegel beteiligt (Yang *et al.*, 1999; Hänel *et al.*, 2007).

Intrazelluläres S1P ist in der Lage Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern durch einen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) unabhängigen Weg freizusetzen. Der genaue Mechanismus und der intrazelluläre Angriffspunkt dieser Ca^{2+} -Freisetzung konnte bisher nicht aufgeklärt bzw. identifiziert werden (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003a; Young und Nahorski, 2001). Es wird jedoch angenommen, dass S1P einen spezifischen Ca^{2+} -permeablen Kanal am Endoplasmatischen Retikulum (ER) aktiviert (Gosh *et al.*, 1994). Ebenfalls stimuliert intrazelluläres S1P das Zellwachstum und hemmt die Apoptose von Zellen (van Brocklyn *et al.*, 1998; Olivera *et al.*, 1999). Das Schicksal einer Zelle hängt dabei von der dynamischen Balance zwischen dem pro-apoptotischen Ceramid und dem proliferativ wirkenden S1P ab (Spiegel und Milstien, 2003). Aufgrund der Aktivierung der SphK durch verschiedene Agonisten können die zellulären S1P-Konzentrationen schnell und transient ansteigen (Pitson *et al.*, 2000a). So führt die Aktivierung der SphK durch Überlebensfaktoren zu einer gesteigerten, intrazellulären S1P-Bildung, wodurch die durch Ceramid induzierte Aktivierung der Apoptose-auslösenden Stress-aktivierten Proteinkinase und Jun-aminoterminalen Kinase in Zellen unterdrückt wird (Cuvillier *et al.*, 1996; 1998). Verschiedene Zellen werden auch durch die erhöhte Aktivität des insbesondere bei Entzündungsreaktionen hochregulierten

Transkriptionsfaktors NF- κ B vor dem Zelltod geschützt, dessen Aktivität ebenfalls durch erhöhtes S1P stimuliert wird (Malinin *et al.*, 1997; Stehlik *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

2.2. Sphingosinkinasen

Bisher sind zwei Isoformen der SphK in Säugetieren beschrieben worden, von denen die SphK1 bereits im Jahre 1998 aus der Rattenniere isoliert wurde (Olivera *et al.*, 1998), während die deutlich größere SphK2 erst zwei Jahre später aus der Maus isoliert werden konnte (Liu *et al.*, 2000). Die beiden SphK sind evolutionär konservierte Enzyme und weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit zueinander auf (Spiegel und Milstien, 2003). Sie besitzen in ihrer Sequenz fünf hochkonservierte, homologe Domänen, die mit C1-C5 bezeichnet werden. Die katalytische Domäne mit Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle umfasst die Domänen C1-C3 und zeigt eine Homologie zu den katalytischen Domänen der Diacylglycerolkinasen und Ceramidkinasen (Pitson *et al.*, 2000a; 2002). Die C4-Domäne ist dagegen an der Substratbindung beteiligt (Yokota *et al.*, 2004).

Beide SphK werden in fast allen Geweben exprimiert, wobei die SphK1 jedoch überwiegend in Lunge und Milz exprimiert wird (Melendez *et al.*, 2000). Die SphK2 ist hingegen vermehrt in der Leber und im Herzen vorhanden (Stunff *et al.*, 2004). Beide SphK sind vorwiegend cytosolisch lokalisierte Enzyme, wobei SphKs auch assoziiert an membranären Strukturen und im Nukleus nachgewiesen werden konnten (Igarashi *et al.*, 2003; Yoshimoto *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2000a). So soll die SphK1 zu 30 % membranassoziiert sein, obwohl transmembrane Domänen nicht vorhanden sind (Nava *et al.*, 2000). Die SphK2 besitzt dagegen vier putative transmembrane Domänen und kann, zelltypspezifisch und je nach Dichte, auch im Kern lokalisiert sein (Spiegel und Milstien, 2003; Igarashi *et al.*, 2003). Die SphK1-Sequenz enthält zwei vermeintliche Ca²⁺/Calmodulin-Bindungsstellen, verschiedene mögliche Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A Phosphorylierungsstellen und eine mögliche Phosphorylierungsstelle der Caseinkinase II (Roads und Friedberg, 1997; Kohama *et al.*, 1998).

Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit gibt es zahlreiche Eigenschaften, in denen sich die SphK1 und SphK2 deutlich voneinander unterscheiden (Alemany *et al.*, 2007). So ist der Zeitpunkt ihrer Expression während der Entwicklung verschieden. Die beiden SphK unterscheiden sich außerdem in ihren katalytischen Eigenschaften, in ihrer Größe, in ihrem Verhalten gegenüber Salzkonzentrationen und Detergentien und in ihrer Substratspezifität (Liu *et al.*, 2000; Taha *et al.*, 2006; Hait *et al.*, 2006). Die SphK1 phosphoryliert bevorzugt D-

erythro-Sphingosin (Kohama *et al.*, 1998). Die SphK2 besitzt ein breiteres Substratspektrum und phosphoryliert bevorzugt *D-erythro*-Dihydrosphingosin. Aber auch Phytosphingosin, das durch SphK1 nicht erkannt wird, der SphK1-Inhibitor DL-threo-Dihydrosphingosin (Liu *et al.*, 2000) sowie das immunmodulatorische Sphingosin-Analogon FTY720 werden durch die SphK2 phosphoryliert. FTY720 wird im Gegensatz dazu durch die SphK1 nur im geringen Ausmaß phosphoryliert. (Paugh *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2003; Kharel *et al.*, 2005). Diese Unterschiede lassen darauf schließen, dass die SphK1 und SphK2 unterschiedliche physiologische Rollen besitzen (Liu *et al.*, 2000; Igarashi *et al.*, 2003). Die murine SphK1 zeigt im Vergleich mit der humanen SphK1 keine Unterschiede in der Stabilität, Aktivität und subzellulären Lokalisation (Kihara *et al.*, 2006).

Die Überexpression der SphK1 stimuliert das Zellwachstum und inhibiert die Apoptose. (Olivera *et al.*, 1999; Bektas *et al.*, 2005). Die SphK1 ist in Tumorzellen hochreguliert und besitzt zudem ein onkogenes Potential (Xia *et al.*, 2000; Edsall *et al.*, 2001; Milstien und Spiegel, 2006; Kawamori *et al.*, 2006). So haben Studien gezeigt, dass in einer Vielzahl von menschlichen Tumoren erhöhte *messenger* RNA (mRNA)-Spiegel der SphK1 vorliegen (French *et al.*, 2003).

Viele Berichte deuten darauf hin, dass die SphK1 zwei verschiedene Funktionen mit unterschiedlichen Aktivitäten besitzt: Erstens, eine essentielle basale Aktivität, die wohl für die Zellorganisation und dem Sphingolipid-Metabolismus wichtig ist und zweitens, eine regulierbare, signalgebende Funktion, bei der die Aktivierung und Lokalisation der SphK1 eine große Rolle spielt (Pitson *et al.*, 2000a; Saba und Hla, 2004). Dabei soll der Aktivierung der SphK jedoch nicht so eine große Rolle zukommen, sondern eher die Lokalisation der intrazellulären S1P-Bildung entscheidend für die durch S1P vermittelten zellulären Antworten sein (Safadi-Chamberlain *et al.*, 2005).

Die Aktivität der SphK kann durch eine Vielzahl von Rezeptor-Agonisten und anderer Stimuli, wie z. B. Wachstums- und Überlebensfaktoren, Vitamin D3, Cytokine, Muskarinrezeptor-Agonisten, ATP, Phorbolster und Antigene deutlich gesteigert werden (Alemany *et al.*, 1999; Melendez *et al.*, 1998; Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998; 1999; Olivera und Spiegel, 1993; Spiegel und Milstien, 2002; Manggau *et al.*, 2001; Kleuser *et al.*, 1998). Saure Phospholipide wie Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Cardiolipin können ebenfalls die SphK aktivieren, während neutrale Phospholipide, wie z. B. Phosphatidylcholin, keinen Einfluss auf die Aktivität ausüben (Olivera *et al.*, 1996; Pitson *et al.*, 2000a). Auch der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, durch

Thapsigargin und Ionomycin, aktivieren die SphK1 (Chin *et al.*, 2002; Alemany *et al.*, 2001). Durch die Agonist induzierte Aktivierung der SphK1 werden die zellulären S1P-Konzentrationen erhöht, was für die Auslösung der durch S1P vermittelten zellulären Wirkungen wichtig ist.

Obwohl die SphK1 ein vorwiegend cytosolisch lokalisiertes Enzym ist, haben Untersuchungen gezeigt, dass die Aktivierung der SphK1, z. B. durch Phorbolester wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), durch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z. B. *platelet derived growth factor* (PDGF) oder durch die Aktivierung muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren, von der Translokation des Enzyms an die Plasmamembran begleitet wird (Johnson *et al.*, 2002; Pitson *et al.*, 2003; Toman *et al.*, 2004; Wattenberg *et al.*, 2006). Rezeptoren, die hauptsächlich an G_i-Proteine koppeln oder auch Rezeptor-Tyrosinkinasen, erhöhen zwar die SphK-Aktivität, beeinflussen aber nicht die Lokalisation der SphK1 in HEK-293-Zellen (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998; 1999; Danneberg, 2003).

Die molekularen Mechanismen, die die Aktivität und subzelluläre Lokalisation der SphK1 regulieren, sind noch nicht vollständig verstanden. Die Translokation der SphK1 an die Plasmamembran beruht entweder auf Protein-Protein-Interaktionen oder auf einer Interaktion der SphK1 mit Membranbestandteilen (Xia *et al.*, 2002; Maceyka *et al.*, 2004; Delon *et al.*, 2004; Stahelin *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass die Ca²⁺/Calmodulinsequenzen für die durch Ca²⁺ freisetzende Agonisten induzierte Translokation des Enzyms zur Plasmamembran benötigt werden, diese jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben (Young *et al.*, 2003).

In einer wichtigen Studie wurde in HEK-293-Zellen gezeigt, dass PKC-aktivierende Agonisten, wie PMA und das pleiotrope Cytokin TNF- α , die SphK1-Phosphorylierung induzieren, wodurch die Aktivität der SphK1 gesteigert wird und sie vom Cytosol an die Plasmamembran transloziert (Johnson *et al.*, 2002; Pitson *et al.*, 2003). Endothelzellen werden durch die TNF- α induzierte Phosphorylierung der Aminosäure Ser²²⁵ der SphK1 und der damit einhergehenden SphK1-Aktivierung vor dem durch TNF- α induzierten apoptotischen Effekt geschützt. S1P fungiert dabei als Antagonist der durch TNF- α induzierten Apoptose und stimuliert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Xia *et al.*, 2002). Für die durch TNF- α und PMA induzierte Aktivierung und Translokation der humanen Sphk1 an die Plasmamembran wird die Phosphorylierung des Ser²²⁵ der SphK1 durch eine *extracellular regulated kinases* (ERK)-ähnliche Kinase benötigt (Pitson *et al.*,

2003). Dabei soll die Translokation auch auf der hohen Affinität der humanen SphK1 für den Membranbestandteil Phosphatidylserin beruhen. So soll durch die Phosphorylierung des Ser²²⁵ die Affinität der SphK1 zum membranständigen Phosphatidylserin erhöht werden, an das die SphK1 mit den Seitenketten der Aminosäuren Thr⁵⁴ und Arg⁸⁹ in Folge der Phosphorylierung spezifisch bindet (Stahelin *et al.*, 2005). Dabei soll die Phosphorylierung über elektrostatische Wechselwirkungen oder eine Konformationsänderung die Interaktion der beiden Aminosäuren Thr⁵⁴ und Arg⁸⁹ der SphK1 mit dem Phosphatidylserin ermöglichen, die für die Translokation des Enzyms an die Plasmamembran verantwortlich ist (Stahelin *et al.*, 2005). Diese Phosphorylierung und die anschließende Translokation der SphK1 wird für die proliferativen und anti-apoptotischen Wirkungen der SphK1 benötigt (Pitson *et al.*, 2005).

Für die durch TNF- α induzierte Aktivierung der SphK1 an der Membran, die zur Aktivierung von NF- κ B und einem erhöhten Überleben führt, wird die Interaktion der SphK1 mit dem Adapter Molekül TRAF2 benötigt. Die TRAF2-Bindungsdomäne befindet sich im C-terminalen Bereich des Enzyms (Xia *et al.*, 2002). Interessanterweise ist diese Interaktion nicht für die durch PMA induzierte Aktivierung der SphK1 notwendig, obwohl beide Agonisten die Translokation der SphK1 zur Plasmamembran durch eine ERK-ähnliche Kinase abhängige Phosphorylierung des Ser²²⁵ der SphK1 induzieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Aktivierung der SphK1 an der Plasmamembran verschiedenen Mechanismen unterliegt (Xia *et al.*, 2002). Die SphK1-Aktivität wird nicht nur posttranskriptional hochreguliert, sondern kann auch durch transkriptionelle Prozesse gesteigert werden. So aktiviert die PKC ERK-abhängig die Transkription der SphK1 durch Stimulierung dessen Promotors (Buehrer *et al.*, 1996; Nakade *et al.*, 2003).

Eine Folge der durch Agonisten induzierten Translokation der SphK1 zur Plasmamembran ist die lokal an der Plasmamembran erhöhte Bildung von S1P. Dieses kann exportiert werden und einen Einfluss auf die in der Plasmamembran lokalisierten S1P-Rezeptoren haben (Pitson *et al.*, 2003; Olivera *et al.*, 2006). Viele verschiedene Zelltypen, wie z. B. Mastzellen oder auch Tumorzellen, exportieren S1P und mittlerweile offenbarten zahlreiche verschiedene Untersuchungen eine autokrine/parakrine Wirkung des S1P (Mitra *et al.*, 2006; Toman *et al.*, 2004; Meyer zu Heringdorf und Jakobs 2007). So induzierte die Überexpression der SphK1 in NIH 3T3-Fibroblasten die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten, stimulierte die Proliferation, inhibierte Apoptose und imitierte so die Wirkungen von extrazellulären S1P (Olivera *et al.*, 2003).

Die Stimulation der SphK1 durch verschiedene Wachstumsfaktoren und TNF- α führt zur erhöhten intrazellulären S1P-Produktion, welches autokrin/parakrin wirken kann und S1P-Rezeptoren in der Plasmamembran aktivieren kann (Saba und Hla, 2004). Ein Beispiel für solch eine Rezeptor-Kreuzaktivierung stellt die Notwendigkeit der S1P₁-Rezeptoraktivierung für die durch den *nerve growth factor* (NGF) induzierte Neuritenausdehnung dar. So induziert NGF durch die Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors TrkA die SphK1-Translokation sowie die lokal an der Plasmamembran erhöhte S1P-Produktion und die Internalisierung des S1P-Rezeptors S1P₁ (Toman *et al.*, 2004). Die SphK1-Aktivierung durch den IgE-Rezeptor Fc ϵ RI in Mastzellen führt über eine Translokation zur Bildung von S1P, welches wiederum nach dem Export die S1P₁- und S1P₂-Rezeptoren aktiviert (Jolly *et al.*, 2004). Während die Aktivierung des S1P₁-Rezeptors eine entscheidende Rolle bei der Migration und Reorganisation des Cytoskeletts in Mastzellen besitzt, wird die Aktivierung des S1P₂-Rezeptors für die Degranulierung benötigt (Melendez *et al.*, 2004; Jolly *et al.*, 2004; 2005).

Ebenfalls kann der S1P₁-Rezeptor durch PDGF aktiviert werden. Die Stimulation von HEK-293-Zellen mit PDGF führt über die Aktivierung und Translokation der SphK1 zur Bildung von S1P an der Plasmamembran, welches aus den Zellen geschleust werden kann und autokrin/parakrin über den S1P₁-Rezeptor zur Aktivierung von ERK1 und ERK2 führt (Alderton *et al.*, 2001). Diese S1P-induzierte Aktivierung ist essentiell für die PDGF-gerichtete Zellbewegung (Hobson *et al.*, 2001). Der S1P₂-Rezeptor wird auch durch PDGF transaktiviert und wirkt negativ auf die durch die Aktivierung des S1P₁-Rezeptors induzierte Zellbewegung (Goparaju *et al.*, 2005).

Neuere Berichte beschreiben jedoch, dass das Zusammenspiel von S1P₁ und PDGF unabhängig von autokrinen/parakrinen S1P sein soll, da die PDGF-gerichtete Zellbewegung auch durch katalytisch inaktive S1P₁-Mutanten erhöht wird (Waters *et al.*, 2006). Bei diesem Modell der Rezeptor-Kreuzaktivierung sollen die S1P₁- und PDGF β -Rezeptoren einen Signalkomplex bilden, der durch PDGF cointernalisiert wird und so die Aktivität von ERK1/2 reguliert (Waters *et al.*, 2003). *Transforming growth factor* (TGF)- β -Rezeptoren scheinen auch an der durch S1P induzierten Migration beteiligt zu sein. Die Expression eines funktionell inaktiven TGF- β Typ I-Rezeptors hemmte die durch S1P induzierten migratorischen Effekte in epidermalen Zellen (Sauer *et al.*, 2004). S1P wirkt auch anti-inflammatorisch, indem es TGF- β -vermittelte Signalwege, die zur Aktivierung von Smad-Proteinen führen, kreuzaktivieren kann (Xin *et al.*, 2004). Wichtige Studien zeigten, dass S1P auch in der Lage ist, durch eine Rezeptor-Kreuzaktivierung *vascular endothelial growth*

factor-Rezeptoren in Endothelzellen zu aktivieren (Tanimoto *et al.*, 2002). Auch *insulin like growth factors* (IGF) Typ 1 und 2 vermitteln ihre G-Protein-abhängige ERK1/2-Aktivierung über eine SphK1-abhängige Transaktivierung von S1P-Rezeptoren (El Shewy *et al.*, 2006).

Trotz der vielen Untersuchungen zur Rezeptorkreuzaktivierung und der autokrinen/parakrinen Wirkung des S1P ist immer noch unklar, wie S1P die an der Zelloberfläche lokalisierten S1P-Rezeptoren aktivieren kann und ob es sich dabei um einen Transporter-vermittelten Export handelt oder ob S1P in Vesikeln gespeichert aus den Zellen ausgeschleust wird (Johnson *et al.*, 2002; Hla, 2003). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *ATP binding cassette* (ABC)-Transporter am Export von S1P aus Thrombozyten beteiligt sind (Kobayashi *et al.*, 2006). ABC-Transporter exportieren eine Vielzahl cytotoxisch-wirkender Therapeutika, aber auch physiologische Substrate aus Krebszellen. Sie spielen wahrscheinlich bei der Entwicklung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in vielen Krebsarten, wie z. B. Lungen- oder Prostatakrebs, eine wichtige Rolle (Munoz *et al.*, 2007). Eine neue Arbeit zeigte, dass der ABCC1-Transporter in Mastzellen an dem Export von S1P beteiligt ist (Mitra *et al.*, 2006), welches nach der Sekretion S1P-Rezeptoren aktivieren kann. Die genetische Ausschaltung oder Inhibierung des ABCC1 verminderte deutlich den Export von S1P in Mastzellen (Mitra *et al.*, 2006). So könnte die S1P-Sekretion über dieses aktive Transportsystem zumindest zum Teil die Migration von Mastzellen zum Antigen und zu den Entzündungsorten regulieren (Mitra *et al.*, 2006).

Bislang ist nur wenig über die Funktion der SphK2 bekannt. Im Unterschied zur SphK1 induziert die SphK2 die S1P-Rezeptor unabhängige Apoptose von Zellen und unterdrückt die Proliferation (Liu *et al.*, 2003; Maceyka *et al.*, 2005). Die SphK2-Expression erhöht die Produktion von Ceramid, während die Expression der SphK1 die Ceramid-Produktion vermindert (Maceyka *et al.*, 2005). Dabei soll die Lokalisation der beiden Isoenzyme in unterschiedlichen Zellkompartimenten für ihre entgegengesetzten Wirkungen verantwortlich sein (Spiegel und Milstien, 2006). Weiterhin wird vermutet, dass die SphK2 auch an wichtigen physiologischen Prozessen wie der Gefäßbildung oder der Immunantwort beteiligt sein könnte (Liu *et al.*, 2000; Mizugishi *et al.*, 2005; Zemann *et al.*, 2006). Bisher konnte durch den *epidermal growth factor*, den PKC-Aktivator PMA und eine Kreuzaktivierung durch den IgE-Rezeptor FcεRI die SphK2-Aktivität stimuliert werden (Olivera *et al.*, 2006; Hait *et al.* 2005; 2007). Die durch *epidermal growth factor* und PMA stimulierte Aktivierung der SphK2 wird durch die ERK1-abhängige Phosphorylierung der SphK2 vermittelt (Hait *et al.*, 2007), wobei die Aktivierung durch EGF und PMA nicht die subzelluläre Lokalisation der

SphK2 beeinflusst (Hait *et al.* 2005; Sutherland *et al.*, 2006). Interessanterweise induzierte auch die Stimulation G_q-gekoppelter Rezeptoren keine Translokation der SphK2 (Danneberg, 2003). Hingegen induziert die Kreuzaktivierung des IgE-Rezeptors durch Antigene in murinen und humanen Mastzellen sowohl eine Translokation der SphK1 als auch der SphK2 (Olivera *et al.*, 2006).

SphK1- oder SphK2-defiziente Mäuse sind lebensfähig und fertil, während die Deletion beider SphK zum Tod der doppeldefizienten Mäuse im Laufe der Embryogenese aufgrund von Defekten in der Angiogenese, Neurogenese und der Schließung des Neuralrohres führt. Dies spricht dafür, dass beide Isoenzyme sich gegenseitig ersetzen können (Mizugishi *et al.*, 2005).

Der SphK/S1P Signaltransduktionsweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Ca²⁺-Freisetzung durch eine Vielzahl von Plasmamembran-Rezeptoren (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998). Durch Einsatz der SphK-Inhibitoren DL-threo-Dihydrosphingosin oder N, N-Dimethylsphingosin konnten z. B. die durch Muskarin-, Lysophosphatidsäure (LPA)- und Antigen-Rezeptoren ausgelösten Anstiege der intrazellulären freien Calciumkonzentration ([Ca²⁺]_i) in unterschiedlichem Maße gehemmt werden (Choi *et al.*, 1996; Melendez *et al.*, 1998; Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998). Auch die Ausschaltung einer SphK-Isoform führte zur Hemmung der Ca²⁺-Mobilisierung durch diese Rezeptoren (Melendez und Khaw, 2002). Somit besteht neben dem Phospholipase C (PLC)/IP₃-Signaltransduktionsweg ein weiterer Weg über die SphK, der an der Ca²⁺-Freisetzung durch eine Vielzahl von Rezeptoren beteiligt ist.

2.3. S1P-Rezeptoren

Extrazelluläres S1P fungiert als Agonist für fünf spezifische G-Protein-gekoppelte Zelloberflächenrezeptoren, die ursprünglich als *endothelial differentiation gene* (EDG)-Rezeptoren bezeichnet wurden (Goetzl und An, 1998; Pyne und Pyne 2000; Hla, 2003; Taha *et al.*, 2004). Der Name EDG leitet sich von dem erstmals im Jahre 1990 aus differenzierenden Endothelzellen isolierten EDG1-Rezeptor ab. Dieser Rezeptor wird in der Differenzierungsphase von Endothelzellen vermehrt exprimiert und ist dementsprechend benannt worden (Hla und Maciag, 1990). Die Aktivierung dieses Rezeptors durch seinen hochaffinen Liganden S1P wurde erst viel später erkannt. In den folgenden Jahren wurden vier dem EDG1 verwandte Rezeptoren namens EDG3, EDG5, EDG6 und EDG8 identifiziert, die ebenfalls mit S1P interagieren (Spiegel und Milstien, 2000). Im Laufe der Zeit setzte sich

die Nomenklatur der *International Union of Pharmacology* für die EDG-Rezeptorfamilie durch. Nach deren Richtlinien werden Rezeptoren mit der Abkürzung des natürlichen Liganden höchster Affinität bezeichnet und in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit einer tiefgestellten arabischen Zahl nummeriert. So werden die fünf S1P-spezifischen EDG-Rezeptoren nun als S1P₁₋₅ bezeichnet (Chun *et al.*, 2002).

Die meisten der durch S1P vermittelten Wirkungen, wie z. B. Proliferation, Migration und Morphogenese, beruhen auf der Interaktion von S1P mit dessen Rezeptoren (Rosen und Goetzl, 2004; Saba und Hla, 2004). Die S1P-Rezeptoren besitzen zellspezifische Expressionsmuster und sind an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt. Zu diesen G-Proteinen gehören die Pertussis-Toxin (PTX)-sensitiven G_{i/0}- und die PTX-insensitiven G_{12/13}- und G_q-Proteine, durch deren Aktivierung vielfältige Wirkungen des S1P vermittelt werden (Ishii *et al.*, 2004). Die S1P-Rezeptoren S1P₁₋₃ werden ubiquitär exprimiert, während der S1P₄-Rezeptor vorwiegend im hämatopoetischen System und im Immunsystem vorkommt (Graeler *et al.*, 1998). Der S1P₅-Rezeptor wird dagegen überwiegend im Gehirn und in der Milz exprimiert (Ishii *et al.*, 2004).

In zahlreichen Publikationen wird die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege durch die verschiedenen S1P-Rezeptoren, wie z. B. des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweges, der Stimulierung von PLC, der Mobilisierung von intrazellulär gespeicherten Ca²⁺ oder der Inhibierung der Adenylylzyklase beschrieben (Lee *et al.* 1996; Okamoto *et al.* 1998; Zondag *et al.* 1998). Außerdem haben sie über die GTPasen Rho und Rac einen Einfluss auf das Cytoskelett und die Zellmigration (Spiegel und Milstien, 2002).

Der S1P₁-Rezeptor koppelt ausschließlich an das G-Protein G_i (Windh *et al.*, 1998) und vermittelt eine S1P-abhängige Aktivierung von ERK1 und ERK2, Aktivierung der PLC sowie Inhibierung der Adenylylcyclase. Des Weiteren induziert der S1P₁-Rezeptor die Migration und Chemotaxis von Zellen unter Beteiligung der Phosphatidylinositol-3-Kinase und nachgeschalteter Aktivierung der GTPasen Rac und Rho (Ishii *et al.*, 2004; Siehler und Manning, 2002; Kluk und Hla, 2001). Dabei aktiviert der S1P₁-Rezeptor die Serin/Threoninkinase Akt, welche wiederum den S1P₁-Rezeptor phosphoryliert, was für die S1P₁-vermittelte Rac-Aktivierung und Zellmigration erforderlich ist. Die Aktivierung von Akt durch andere Stimuli könnte so auch eine Liganden-unabhängige S1P₁-Rezeptoraktivierung ermöglichen (Lee *et al.*, 2001). Die Überexpression des S1P₁-Rezeptors in HEK-293-Zellen führt zu einer verstärkten Zellaggregation und induziert die Hochregulierung der P- und E-Cadherine (Lee *et al.*, 1998). Der S1P₁-Rezeptor besitzt eine essentielle Rolle bei der

Blutgefäßbildung (English *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Die Ausschaltung des S1P₁-Rezeptors in Mäusen führt zu Hämorrhagien und zum Tod im Verlaufe der Embryogenese, da bei ihnen der Aufbau funktioneller Blutgefäße inhibiert wird (Liu *et al.*, 2000). Dieser Effekt wird durch eine verringerte Migration der Perizyten zu den Gefäßwänden hervorgerufen, wofür die S1P₁-Expression in den Endothelzellen benötigt wird (Allende *et al.*, 2003). Eine weitere wichtige Rolle spielt der S1P₁-Rezeptor bei der Auswanderung der Lymphozyten aus den sekundären Lymphknoten in Antwort auf S1P (Sanna *et al.*, 2004). Eine Besonderheit zeigt der S1P₁-Rezeptor bei der Ca²⁺-Mobilisierung. In CHO-, RH7777- und HEK-293-Zellen konnte gezeigt werden, dass über diesen Rezeptor PKC- und G_i-abhängig, Ca²⁺-Anstiege durch Agonisten gehemmt werden können (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003).

Mit Hilfe von computersimulierten Struktur- und Sequenzanalysen, sowie Punktmutationen und anschließenden Radioligandenbindungsassays konnten die Aminosäuren identifiziert werden, die die Bindung des S1P an den S1P₁-Rezeptor vermitteln. So binden die basischen Aminosäuren Arg¹²⁰ und Arg²⁹² per ionischer Bindung die Phosphatgruppe des S1P, während die anionische Aminosäure Glu¹²¹ die protonierte Aminogruppe des S1P bindet (Parril *et al.*, 2000). Nach der Aktivierung durch exogenes S1P wird der S1P₁-Rezeptor, verpackt in endosomalen Vesikeln, internalisiert (Watterson *et al.*, 2002). Der Mechanismus der S1P₁-Internalisierung gleicht wahrscheinlich dem der β -adrenergen Rezeptoren und dem vieler anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Liu *et al.*, 1999; Watterson *et al.*, 2002; Kenneth *et al.*, 2002; Hobson *et al.*, 2001). Die Rezeptoraktivierung durch den Liganden induziert die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten am C-Terminus des Rezeptors durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen oder durch *second messenger*-aktivierte Kinasen (Krupnick und Benovic, 1998; Luttrell *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Der phosphorylierte Rezeptor interagiert mit β -Arrestin, das einerseits den Rezeptor zur Desensitisierung von G-Proteinen entkoppelt und andererseits zu einer schnellen Internalisierung des Rezeptors über dessen Einschluss in Clathrin bedeckte Vesikel führt (McDonald *et al.*, 2000; Defea *et al.*, 2000; Laporte *et al.*, 1999; Hobson *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung und anschließende Internalisierung des Rezeptors ist auch für die Aktivierung von Signaleffekten wichtig, an denen z. B. die MAPK beteiligt ist (Daaka *et al.*, 1998; Kenneth *et al.*, 2002).

Neben der durch S1P induzierten S1P₁-Rezeptorinternalisierung gibt es auch noch eine Agonisten-unabhängige und durch die PKC induzierte S1P₁-Rezeptorinternalisierung. Diese unterscheidet sich aber im zeitlichen Verlauf und im Phosphorylierungsmuster von der

Agonist-induzierten Rezeptorinternalisierung und unterliegt damit einem anderen Mechanismus (Watterson *et al.*, 2002).

Der S1P₂-Rezeptor koppelt an die G-Proteine G_{i/o}, G_q, G_{12/13} und möglicherweise an G_s und vermittelt die S1P-induzierte Proliferation und die Aktivierung von PLC und Rho (Sihler und Manning, 2002; Ishi *et al.*, 2004; Meyer zu Heringdorf und Jakobs, 2007). Im Gegensatz zum S1P₁-Rezeptor inhibiert der S1P₂-Rezeptor über G_{12/13}-Proteine die Aktivierung von Rac und führt zur Hemmung der Zellmigration (Okamoto *et al.*, 2000). Weiterhin induziert der S1P₂-Rezeptor in verschiedenen Expressionssystemen PLC-vermittelte [Ca²⁺]_i-Anstiege (An *et al.*, 1999). S1P₂-defiziente Mäuse sind lebensfähig, zeigen keine phänotypischen Defekte, weisen aber gelegentlich spontan auftretende epileptische Anfälle auf (MacLennan *et al.*, 2001). Eine kürzlich erschienene Publikation zeigte, dass S1P₂-defiziente Mäuse, wahrscheinlich aufgrund von schweren Zelldefekten in der *Stria vascularis*, taub sind (Kono *et al.*, 2007).

Vermutlich besitzt der S1P₂-Rezeptor eine Bedeutung bei der neuronalen Entwicklung während der Embryogenese (MacLennan *et al.*, 1997), obwohl keine bedeutende S1P₂-Expression während der Embryogenese von Mäusen festgestellt werden konnte (McGiffert *et al.*, 2002). Des Weiteren führt die Stimulation des S1P₂-Rezeptors mit S1P zum Abrunden von neuronalen Zellen und zur Neuritenretraktion (Ishi *et al.*, 2004). Auch während der Herzentwicklung scheint der S1P₂-Rezeptor eine physiologische Rolle zu besitzen. Die Deletion des S1P₂-Rezeptorgens im Zebrafisch „*miles apart*“ führt aufgrund defizitärer Migration der Kardiomyoblasten während der Organogenese zur Entwicklung von zwei separaten Herzen (Kupperman *et al.*, 2000). Ein analoger Phänotyp konnte in S1P₂-defizienten Mäusen nicht beobachtet werden (MacLennan *et al.*, 2001; Ishi *et al.*, 2002).

S1P₃ stimuliert die gleichen G-Proteine wie S1P₂ und ähnelt in seinem intrazellulären Signalverhalten diesem Rezeptorsubtyp. Jedoch erhöht der S1P₃-Rezeptor die Aktivität von Rac und löst dadurch, wie der S1P₁-Rezeptor, migratorische Effekte aus, die vor allem bei der Angiogenese essentiell sind (Ishii *et al.*, 2004). Die Stimulierung des S1P₃-Rezeptors durch S1P induziert die Zellproliferation und das Überleben. Auch führt die Aktivierung des Rezeptors zum Abrunden von Zellen, zur Aktivierung der PLC, zur Ca²⁺-Mobilisierung und zur Rho-Aktivierung (Ishii *et al.*, 2004). Die gezielte Ausschaltung des S1P₃-Gens führt in Mäusen zu keinen phänotypischen Abnormalitäten (Ishii *et al.*, 2002). Der S1P₃-Rezeptor induziert weiterhin die NO-Synthase und Vasorelaxation durch [Ca²⁺]_i-Anstiege und Akt-Stimulation (Nofer *et al.*, 2004). Weiterhin verlangsamt der S1P₃-Rezeptor die Herzschlagrate

durch Aktivierung von G_i-abhängigen, einwärts gerichteten Kaliumkanälen (Himmel *et al.*, 2000).

Der S1P₄-Rezeptorsubtyp ist vor allem in die Regulation von immunologischen Prozessen involviert und koppelt an die G-Proteine G_i und G_{12/13} (Wang *et al.*, 2005; Siehler und Manning, 2002). Über die physiologische Bedeutung von S1P₅ ist bislang nur wenig bekannt. Die S1P-induzierte Stimulation dieses Rezeptors zeigt gegensätzliche Effekte zu den anderen S1P-Rezeptoren und induziert durch die Inhibierung der MAPK eine Hemmung des Zellwachstums (Malek *et al.*, 2001). Sowohl in CHO-K1 als auch in HEK-293-Zellen verursachte die S1P-induzierte Stimulierung des S1P₅-Rezeptors eine intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung (Pyne and Pyne 2000; Niedernberg *et al.*, 2002).

Neben diesen S1P-Rezeptoren werden auch noch Rezeptoren einer weiteren Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, nämlich GPR3, GPR6 und GPR12 durch S1P aktiviert (Uhlenbrock *et al.*, 2002).

2.4. S1P-Lyase

Die S1P-Lyase wird in fast allen Geweben und Zellen exprimiert, wobei die Thrombozyten eine Ausnahme darstellen (Yatomi *et al.*, 1995). Sie ist in der Membran des ER verankert und ihr katalytisch aktives Zentrum ist zur cytosolischen Seite des ER gerichtet (Van Veldhoven, 2000). Die S1P-Lyase spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellüberlebens, indem sie das Gleichgewicht zwischen den pro-apoptotischen Ceramid und dem anti-apoptotischen S1P beeinflusst. Die Überexpression der S1P-Lyase induziert die Apoptose durch die Verringerung der intrazellulären S1P-Konzentration und gleichzeitige Erhöhung der Ceramid-Konzentration (Reiss *et al.*, 2004). Die Produkte der S1P-Lyase-Reaktion haben jedoch keinen Einfluss auf die Induktion der Apoptose (Reiss *et al.*, 2004). Die Inhibierung der S1P-Lyase, durch 2-Acetyl-4-Tetrahydroxybutylimidazol (THI) oder genetisch durch den Einsatz von siRNA, führt zu erhöhten S1P-Spiegeln im lymphatischen Gewebe und bewirkt eine Retention der Lymphozyten in den Lymphknoten, was die Bedeutung von S1P bei immunologischen Prozessen widerspiegelt (Schwab *et al.*, 2005).

Interessant war auch die Entdeckung, dass die S1P-Lyase an Tumor-Supressor-Signalwegen beteiligt ist (Oskouian *et al.*, 2006) während eine verminderte Expression der S1P-Lyase, wie sie in metastasierendem Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte, vielleicht die Tumorgenese unterstützt (Ramaswamy *et al.*, 2003). Vor Kurzem konnte auch gezeigt werden, dass FTY720 die Aktivität der S1P-Lyase inhibiert (Bandhuvula *et al.*, 2005).

In embryonalen Karzinomzellen der Maus führt die Ausschaltung des S1P-Lyase-Gens zur Steigerung der durch Retinolsäure induzierten Differenzierung zum primitiven Endoderm (Kihara *et al.*, 2003). S1P-Lyase-defiziente Mäuse sterben ca. 3-4 Wochen nach ihrer Geburt und zeigen Defekte in der vaskulären Entwicklung, Hämorrhagien, sowie Anämien (Schmahl *et al.*, 2007). In Modellorganismen, wie *Drosophila*, *Caenorhabditis. elegans* und *Dictyostelium*, wird die Expression der S1P-Lyase für Prozesse wie Embryogenese, Fortpflanzung, Überleben und Bewegung benötigt (Herr *et al.*, 2003; Mendel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2000). Die Ausschaltung der S1P-Lyase verleiht Zellen eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die S1P-Lyase wichtige und essentielle Funktionen in Zellen und Organismen besitzt, indem sie unter anderem einen Einfluss auf die intrazellulären S1P-Konzentrationen ausübt.

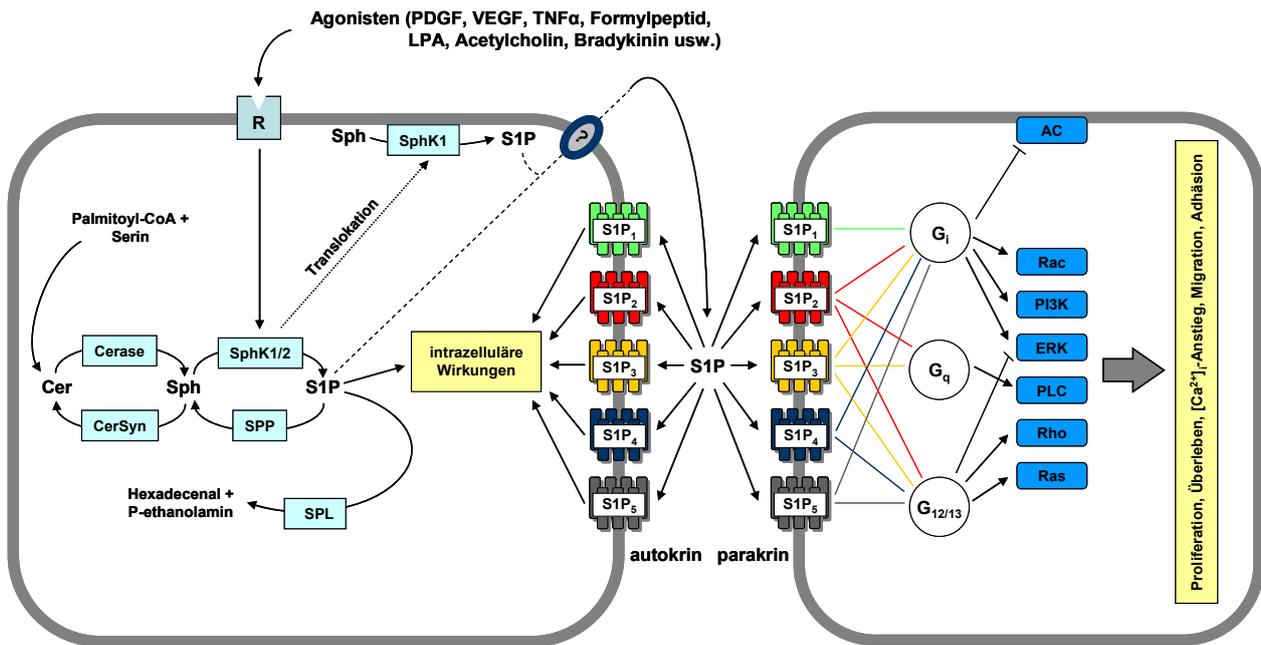


Abbildung (Abb.) 1: Sphingolipid-Metabolismus und durch S1P vermittelte Wirkungen

Sphingosinkinasen katalysieren die Bildung des S1P aus Sphingosin, das entweder intrazellulär wirken kann oder autokrin/parakrin über die Aktivierung der in der Plasmamembran lokalisierten S1P-Rezeptoren und der nachgeschalteten Signalmoleküle seine Wirkungen vermitteln kann. Abgebaut wird das S1P entweder über eine Dephosphorylierung, katalysiert durch die S1P-Phosphatasen, oder durch die irreversible Spaltung in Hexadecenal und Phosphoethanolamin, katalysiert durch die S1P-Lyase. Die SphK1 ist ein vorwiegend cytosolisch lokalisiertes Enzym, jedoch induzieren verschiedene Agonisten eine Steigerung ihrer katalytischen Aktivität und eine Translokation an die Plasmamembran. Dort wird S1P lokal erhöht gebildet, das aus den Zellen exportiert werden kann und seinerseits autokrin/ parakrin S1P-Rezeptoren aktivieren kann.

Cer, Ceramid; Sph, Sphingosin; SPP, S1P-Phosphatase; SPL, S1P-Lyase; R, Rezeptoren; AC, Adenylylcyclase; PI3K, Phosphatidylinositol-3 Kinase; ERK, Cerase, Ceramidase; CerSyn, Ceramid-Synthase; P-ethanolamin, Phosphoethanolamin

(Abb. nach Hait *et al.*, 2006)

2.5. Sphingosin-Analoga

Die Funktion von S1P in der Regulation von immunologischen Prozessen gewann mit dem Nachweis, dass das Sphingosin-Analogon FTY720 seine immunsuppressive Wirkung durch Interaktion mit S1P-Rezeptoren ausübt, zunehmend an Bedeutung (Matloubian *et al.*, 2004). Es wurde erstmals 1992 durch Modifikation der natürlichen Substanz Myriocin hergestellt und befindet sich zurzeit in der Phase III klinischer Studien zur Behandlung der Multiplen Sklerose (Brinkmann *et al.*, 2004; Kappos *et al.*, 2006). Seinen immunsuppressiven Effekt vermittelt FTY720 durch die Retention von Lymphozyten in den Lymphknoten (Matloubian *et al.*, 2004; Pinschewer *et al.*, 2000). FTY720 wird größtenteils durch die SphK2 zu FTY720-Phosphat (FTY720-P) phosphoryliert, welches ein hochpotenter Agonist an S1P-Rezeptoren, mit Ausnahme des S1P₂-Rezeptors ist (Billich *et al.*, 2003; Brinkmann *et al.*, 2002). Im Vergleich zum S1P wird FTY720-P nur durch Phosphatasen gespalten und damit abgebaut, während die S1P-Lyase keinen Effekt auf FTY720-P ausübt (Bandhuvula *et al.*, 2005). Dieser Gegensatz zum kurzlebigen S1P ist eine mögliche Ursache für die Unterschiede des Strukturanalogons in seiner Wechselwirkung mit S1P-Rezeptoren. FTY720 vermindert durch die langanhaltende Internalisierung des S1P₁-Rezeptors die Freisetzung der Lymphozyten aus den sekundären Lymphknoten in Antwort auf S1P (Matloubian *et al.*, 2004). Dies führt zu einer Lymphozytopenie und damit zu einer verminderten zellvermittelten Immunantwort. Diese Lymphozytopenie konnte auch in Mäusen nachgewiesen werden, bei denen der S1P₁-Rezeptor im hämatopoetischen Gewebe ausgeschaltet worden war (Matloubian *et al.*, 2004).

Ein weiteres Sphingosin-Analogon, das cis-4-Methylsphingosin (cis-4-MSph), inhibiert die *de-novo* Sphingolipid-Biosynthese und die Aktivität des Enzyms Serin-Palmitoyltransferase, das den einleitenden Schritt dieses Biosyntheseweges katalysiert (van Echten-Deckert *et al.*, 1997). Das exogene cis-4-MSph wird intrazellulär durch die SphK zum wahrscheinlich bioaktiven Metaboliten cis-4-Methylsphingosin-1-Phosphat (cis-4-MS1P) phosphoryliert. Anders als S1P, das intrazellulär sehr schnell durch die degradierenden Enzyme abgebaut wird und dessen Zellspiegel dadurch sehr gering gehalten werden (Zhang *et al.*, 1991), ist cis-4-MS1P metabolisch stabil und akkumuliert in Zellen (van Echten-Deckert *et al.*, 1997; 1998). Die Inhibierung der *de-novo* Sphingolipid-Biosynthese beruht nicht auf einer direkten Molekül-Molekül Interaktion, sondern unterliegt einem komplexeren, unbekanntem Mechanismus. Das cis-4-MS1P imitiert die Wirkungen des S1P und könnte ebenfalls eine lang andauernde Aktivierung von S1P Signaltransduktionswegen induzieren

(van Echten-Deckert *et al.*, 1997; 1998). Die durch S1P vermittelten Wirkungen, wie z. B. Proliferation oder DNA-Synthese, korrelieren zumindest zum Teil mit der durch S1P induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern von Zellen (Zhang *et al.*, 1991). Die akute Stimulation von Swiss 3T3-Fibroblasten mit cis-4-MSph induzierte ebenfalls eine Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern (van Echten-Deckert *et al.*, 1998).

Cerebrale Neuronen, die mit cis-4-MS1P vorbehandelt wurden, wiesen im Vergleich zum S1P, einen verstärkten apoptotischen Effekt auf (van Echten-Deckert *et al.*, 1997). In Swiss 3T3-Fibroblasten imitierte die Vorbehandlung mit cis-4-MSph auch die mitogene Wirkung des S1P, jedoch war die proliferative Antwort deutlich stärker (van Echten-Deckert *et al.*, 1998). Auch in B104-Neuroblasten akkumuliert cis-4-MS1P und induziert in diesen Zellen einen verstärkten apoptotischen Effekt (Naetzker *et al.*, 2006). Dieses Sphingosin-Analogon übt also einen Zelltyp-spezifischen Effekt aus.

2.6. Fragestellung und Zielsetzung

Wie oben dargestellt, wird zunehmend die Bedeutung der subzellulären Lokalisation des Lipid-Mediators S1P für die jeweilige zelluläre Reaktion erkannt (siehe z. B. Wattenberg *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit sollten die Steuerung der lokalisierten S1P-Bildung und ihre Konsequenzen exemplarisch an drei Beispielen untersucht werden: Einmal an einem System, in welchem die S1P-Bildung gezielt an der Plasmamembran gesteigert wird (G_q -vermittelte SphK-Translokation), einmal an einem Enzym, welches durch seine Lokalisation am ER primär intrazelluläre S1P-Spiegel reguliert (Peest *et al.*, 2008), und schließlich mit Hilfe eines Sphingosin-Analogons, für das bekannt war, dass es intrazellulär phosphoryliert wird, akkumuliert und die Wirkungen von S1P imitieren kann.

Im Vorfeld der Arbeit war gezeigt worden, dass die Stimulation G_q -gekoppelter Rezeptoren nicht nur zu einer Steigerung der SphK-Aktivität führte, sondern auch eine rasche und lang anhaltende Translokation der SphK1 an die Plasmamembran induzierte (Danneberg, 2003). Hierbei war insbesondere die Translokation der murinen, an YFP-gekoppelten SphK1 nach Stimulation des M_3 -Rezeptors in HEK-293-Zellen untersucht worden. Diese Translokation war unabhängig von einem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, einer Entleerung der Ca^{2+} -Speicher, einer Aktivierung der PKC, einer Tyrosinphosphorylierung, vom Aktin-Cytoskelett und von der katalytischen Aktivität der SphK1 (Danneberg, 2003). Die SphK1-Translokation wurde spezifisch durch Stimulation von G_q -gekoppelte Rezeptoren ausgelöst und durch

Coexpression von konstitutiv aktivem $G\alpha_q$, aber nicht von konstitutiv aktivem $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ oder $G\alpha_{12}$ imitiert (Danneberg, 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus der G_q -vermittelten SphK1-Translokation weiter charakterisiert und ihre funktionelle Bedeutung untersucht werden. Die durch TNF- α oder Phorbol ester (PMA) induzierte SphK1-Translokation ist von einer Phosphorylierung des Ser²²⁵ der SphK1 durch eine ERK-ähnliche Kinase abhängig (Johnson *et al.*, 2002; Pitson *et al.*, 2003). Deshalb sollte der Einfluss des M_3 -Rezeptors auf die subzelluläre Lokalisation einer phosphorylierungsdefizienten SphK1-Mutante untersucht werden. Die SphK1-Translokation sollte außerdem mit der Translokation anderer an der G_q -vermittelten Signaltransduktion beteiligten Enzyme verglichen werden. Um die für die Carbachol-induzierte SphK1-Translokation notwendigen Domänen oder Aminosäurenreste zu identifizieren, sollten Fragmente der SphK1 generiert und exprimiert werden und deren Lokalisation und Translokation untersucht werden. Durch Coimmunopräzipitationsstudien sollte die Möglichkeit einer direkten Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und der SphK1 untersucht werden. Eine Folge der durch Agonisten induzierten Translokation der SphK1 zur Plasmamembran ist die lokal erhöhte Bildung von S1P, welches beispielsweise nach Stimulation von NGF- oder Antigen-Rezeptoren aus der Zelle ausgeschleust werden und die in der Plasmamembran lokalisierten S1P-Rezeptoren aktivieren kann (Olivera *et al.*, 2003; 2006; Mitra *et al.*, 2006; Toman *et al.*, 2004). Deshalb sollte untersucht werden, ob auch die Stimulation des M_3 -Muskarinrezeptors zur autokrinen Beeinflussung von S1P-Rezeptoren führen könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle des intrazellulären S1P mit Hilfe von S1P-Lyase-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (*SGPLI*^{-/-}-MEFs) untersucht werden. Die S1P-Lyase ist mit einer transmembranären Domäne am ER verankert und reguliert vor allem intrazelluläre S1P-Spiegel (Peest *et al.*, 2008). Dementsprechend weisen *SGPLI*^{-/-}-MEFs im Vergleich zu den Wildtyp-Mausfibroblasten (*SGPLI*^{+/+}-MEFs) erhöhte S1P-Spiegel auf (van Veldhoven, 2005). Da eine intrazelluläre Freisetzung von S1P eine Mobilisierung von Ca²⁺ aus Thapsigargin-sensitiven Speichern unabhängig von G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren bewirkt (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003a), sollte an den *SGPLI*^{-/-}-MEFs vor allem die Ca²⁺-Homöostase untersucht werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollten die Wirkungen des Sphingosin-Analogons cis-4-Methylsphingosin (cis-4-MSph) näher charakterisiert werden. Cis-4-MSph wird intrazellulär zum metabolisch stabilen cis-4-MS1P phosphoryliert, welches sich anreichert und anscheinend die zellulären Wirkungen des S1P imitieren kann (van Echten-Deckert *et al.*,

1997; 1998). Es sollte untersucht werden, ob das cis-4-MS1P aus der Zelle ausgeschleust werden und auf S1P-Rezeptoren wirken könnte oder ob es intrazellulär die S1P-Lyase-Defizienz imitieren und möglicherweise einen Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase haben könnte. Die Ergebnisse sollten dann mit den Wirkungen des gut charakterisierten Sphingosin-Analogons FTY720 verglichen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Name	Hersteller	Name	Hersteller
Acrylamid	Serva	LPA	Sigma
Agarose	Sigma	Lyso Tracker Red DND 99	Molecular Probes
Ammoniumperoxodisulfat	Serva	Magermilchpulver	Merck
Aprotinin	Sigma	2-Mercaptoethanol	Merck
Bisacrylamid	Serva	MK571	Alexis
Bradykinin	Sigma	Mowiol	Calbiochem
BSA	Sigma	Paraformaldehyd	Sigma
BSA, fettsäurefrei	PAA	Pefabloc	Roth
Brillant Blau G 250	Roth	Phenol	Fluka
Carbachol	Sigma	PMA	Sigma
Chloroquindiphosphat	Sigma	PMSF	Sigma
Digitonin	Sigma	Poly-L-Lysin	Sigma
DMEM/F12 mit L-Glutamin	Gibco BRL	Ponceau S	Sigma
DMSO	Sigma	Probenecid	Molecular Probes
EGTA	Merck	Protein A Sepharose	Amersham
ER Tracker Blue White DPX	Molecular Probes	S1P	Biomol
Ethidiumbromid	Sigma	SDS	Serva
FKS	Gibco BRL	SKI II	Calbiochem
Fluo-4/AM	Molecular Probes	Sphingosin	Biomol
FTY720	Novartis	Sybr Safe	Molecular Probes
Fura-2/AM	Molecular Probes	TEMED	Serva
D (+)-Glukose	Merck	Tetramethylrhodamin	Molecular Probes
Glycerol	Sigma	Thapsigargin	Calbiochem
HEPES	Serva	Tris	Biomol
Ionomycin	Calbiochem	Triton X-100	Roth
IPTG	Stratagene	Trypsin/EDTA Lösung	PAA
LB-Agar	Invitrogen	VPC23019	AvantiPolarLipids
Leupeptin	Sigma	X-Gal	Boehringer
Lipofectamin	Invitrogen		

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel wurden bei der Firma J. T. Baker und die verwendeten Salze bei der Firma Merck Biosciences gekauft.

Die Substanz cis-4-Methylsphingosin wurde freundlicherweise von Frau Priv. Doz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Antikörper

- anti-YFP BD Living Colors full-length A.v., polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, der Firma BD Biosciences Clontech, Heidelberg
- anti-Glu-Glu, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, der Firma Covance, Princeton, New Jersey, U.S.A.
- anti-G $\alpha_{q/11}$, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, der Firma Gramsch Laboratories, Schwabhausen
- anti-Kaninchen IgG/Peroxidase-Konjugat aus Ziege, der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG (H+L) aus Ziege, der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- anti-Maus IgG/FITC-Konjugat aus Ziege, der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- anti-HA aus Maus, der Firma Roche, Grenzach
- anti-FLAG M2 monoklonaler IgG1-Antikörper aus Maus der Firma Firma Stratagene, La Jolla, Californien, U.S.A.
- anti-FLAG-M2-Cy3, monoklonaler IgG1-Antikörper aus Maus der Firma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

3.1.3. Restriktionsenzyme

Name	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>Hind</i> III	5'-A [^] AGCTT-3'	Fermentas
<i>Xho</i> I	5'-C [^] TCGAG-3'	Fermentas

3.1.4. Sonstige Enzyme

Name	Hersteller
Phosphatase, alkalische	Boehringer Mannheim
RNase A	Qiagen

Name	Hersteller
T4 DNA Ligase	Fermentas
Taq-Polymerase	Sigma

3.1.5. Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pDrive	Qiagen
pEYFP	BD Biosciences Clontech
pECFP-C1	BD Biosciences Clontech
pcDNA3	Invitrogen

3.1.6. Verwendete DNA-Konstrukte

Bezeichnung	Erzeuger/Hersteller
pECFP-ER	BD Biosciences Clontech
pECFP-Golgi	BD Biosciences Clontech
pEYFP-mSphK1	K. Danneberg, Institut für Pharmakologie, Essen
pcDNA3.1-S1P ₁ -GFP	T. Hla, U. Connecticut, Farmington, U.S.A.
pcDNA3.1-3xHA-S1P ₂	Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA
pcDNA3.1-3xHA-S1P ₃	Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA
pcDNA3-FLAG-S1P ₁ ^{R292A}	G. Tigyi, U. Tennessee, Memphis, U.S.A.
pcDNA3-FLAG-S1P ₁ ^{K111A}	G. Tigyi, U. Tennessee, Memphis, U.S.A.
pDsRed1-N1-PKD-RFP	O. Rey, U. California, Los Angeles, U.S.A.
pcDNA3-PKC α -CFP	M. Schäfer, Freie Universität Berlin
pcDNA3.1-G α_q ^{Q209L} -EE	Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA
pcDNA3.1-G α_{11} ^{Q209L}	Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA
pcDNA3.1-EGFP-hSphK1-FLAG	S. Pitson, U. Adelaide, Adelaide, Australien
pcDNA3.1-EGFP-hSphK1 ^{S225A} -FLAG	S. Pitson, U. Adelaide, Adelaide, Australien

Bezeichnung	Erzeuger/Hersteller
pcDNA3-hSphK1 ^{G82D} -FLAG	S. Pitson, U. Adelaide, Adelaide, Australien
pEGFP-C2-mSphK1 ¹⁻¹⁶⁹	N. T. Ktistakis, Dep. of Signalling, Cambridge, U. K.
pEGFP-C2-mSphK1 ¹³⁴⁻³⁸⁸	N. T. Ktistakis, Dep. of Signalling, Cambridge, U. K.

3.1.7. Antibiotika

Name	Hersteller
Ampicillin	Grünenthal
G418	PAA
Kanamycin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAA

3.1.8. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen hergestellt oder durch die Firma GATC als Standardprimer zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Sequenz	T_m
pEGFP_C2-FP	5'-GATCACATGGTCCTGCTG-3'	56,9 °C
pEGFP_C2-RP	5'-TTTAAAGCAAGTAAAACCTC-3'	48,2 °C
FhSK1-CFP-FL	5'-AAAATCTCGAGCTATGGATCCAGCGGGCGGC-3'	68,3 °C
RhSK1-CFP-FL	5'-AAAAAAGCTTCCTCATAAGGGCTCTTCTGGCG-3'	60,8 °C
RhSK1-CFP-F1	5'-AAAAGCTTCCTCACATCTCCCCCAG-3'	55,8 °C
RhSK1-CFP-F2	5'-AAAAGCTTCCTCACACGGCCTCGCT-3'	60,6 °C
RhSK1-CFP-F3	5'-AAAAGCTTCCTCACATCTGCTGGGG-3'	55,6 °C
FhSK1-CFP-F4	5'-AAAATCTCGAGCTATGCTCCTGACCAAC-3'	51,7 °C
FhSK1-CFP-F5	5'-AAAATCTCGAGCTATGGGCTCTGGCAAC-3'	55,8 °C
FhSK1-CFP-F6	5'-AAAATCTCGAGCTATGGCTTACCTCCCT-3'	52,7 °C

3.1.9. Verwendete Kits

Name	Hersteller
„Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus“	PerkinElmer
„QIAquick® Gel Extraction Kit“	Qiagen

Name	Hersteller
„MinElute™ Reaction Cleanup Kit“	Qiagen
“Plasmid Mega Kit“ oder „Endo Free® Plasmid Mega Kit“	Qiagen
“Ready Mix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl ₂ ”	Sigma
„Qiagen PCR Cloning Kit“	Qiagen

3.1.10. Molekulargewicht-/DNA-Standards

Name	Hersteller
Molecular Weight Marker (HMW: 205-45 kDa)	Sigma
Molecular Weight Marker (LMW: 66-14 kDa)	Sigma
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas

3.1.11. Medien und Pufferlösungen

LB-Medium

10 g NaCl
 10 g Bacto Trypton
 5 g Hefe-Extrakt
 pH-Wert 7,5
 ad 1 l H₂O
 Für die Herstellung von Agarplatten wurde
 15 g/l LB-Agar hinzugefügt.

10x Tris Borat EDTA Puffer (TBE)

108 g Tris Base
 55 g Borsäure
 9,3 g EDTA
 pH 8,0
 ad 1 l H₂O

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

118 mM NaCl
 5 mM KCl
 1 mM CaCl₂
 1 mM MgCl₂
 15 mM HEPES
 5 mM Glucose
 pH 7,5

10x Phosphate Buffered Saline (PBS)

80 g NaCl
 2 g KCl
 14,4 g Na₂HPO₄
 2,4 g KH₂PO₄
 pH 7,4
 ad 1 l H₂O

Nach 1:10 Verdünnung wurde dem PBS 1
 mM MgCl₂ und 0,5 mM CaCl₂ zugefügt.

Tris-EDTA (TE)-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0
 1 mM EDTA pH 8,0

AIX-Agarplatten

In das LB-Medium wurden folgende Zusätze gegeben:
 0,2 mM IPTG (Stammlösung 0,2 M in H₂O angesetzt und sterilfiltriert)
 0,1 mM X-Gal (Stammlösung 0,1 M in Dimethylformamid angesetzt)
 100 mg/l Ampicillin

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank (LaminarAir HS 12, Heraeus) statt. Alle Lösungen und Medien wurden vor der Benutzung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-293), glatte Gefäßmuskelzellen der Linie A10 aus der Rattenaorta und embryonale Fibroblasten der Maus (MEFs) wurden in einem Brutschrank (BB16, Heraeus) in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM)/F12 mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin G und 0,1 mg/ml Streptomycin wurde sowohl für die HEK-293-Zellen als auch für die Fibroblasten als Nähr- und Kultivierungsmedium eingesetzt. Als Nähr- und Kultivierungsmedium wurde für die Gefäßmuskelzellen der Linie A10 aus der Ratte DMEM, *high glucose* mit 20 % (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin G und 0,1 mg/ml Streptomycin verwendet. Bei den stabil transfizierten HEK-293-Zellen, die den M₃-Rezeptor exprimierten, wurde dem Nährmedium zusätzlich 0,5 mg/ml des Neomycin-Analogons Geneticin (G418) als Selektionsfaktor zugefügt. Zur Passagierung der HEK-293-Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch mehrfaches Aufpipettieren mit 10 ml frischem Medium von der Kulturschale abgelöst. Danach wurden die Zellen auf neue Kulturschalen verteilt.

Die Zellen für die Mikroskopie wurden, nach der oben beschriebenen Ablösung, in 12-Loch-Kulturschalen mit je 2 ml G418-freiem Medium auf zuvor mit 0,00125 % (m/v) Poly-L-Lysin vorbehandelten, mikroskopischen Deckgläschen ausgesät. Für die Subkultivierung der Fibroblasten und der glatten Gefäßmuskelzellen A10 wurde das Nährmedium von den Zellkulturschalen abgesaugt, die Zellen zweimal mit 10 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) der Firma Invitrogen gewaschen und nach mehrminütiger Vorbehandlung mit einer Trypsin-EDTA Lösung mit 10 ml frischem Medium von der Zellkulturschale abgelöst. Danach wurden die Zellen 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturschalen verteilt.

Zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen abgelöst, 5 min bei 1000 x g zentrifugiert, im entsprechendem Nährmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (v/v) und 20 % FKS (v/v) resuspendiert, zu je 1,8 ml in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -70 °C

zwischengelagert. Nach 24 h wurden die Aliquots dann in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt und dort gelagert.

3.2.2. Transfektion und Überprüfung der Transfektionseffizienz

Verwendete Lösungen:

2x Hepes Buffered Saline (HeBS)

280 mM NaCl
50 mM HEPES
1,48 mM Na₂HPO₄
pH 7,05

Die für die Transfektion mittels Calciumphosphat-Methode benutzten Zellen wurden auf 145 cm² Kulturschalen mit Nährmedium ohne G418 kultiviert und bei einer Konfluenz von ca. 80 % transfiziert. Dafür wurden 50 µg der entsprechenden Plasmid-DNA pro 145 cm² Zellkulturschale mit H₂O auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und anschließend durch Zugabe von 25 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 250 µl 100 % Ethanol zur Sterilisation gefällt. Die DNA wurde dann für 10 min bei 12000 x g abzentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA für einige Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 700 µl H₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl 2 M CaCl₂ und 1 ml 2x HeBS wurde der Ansatz mehrfach invertiert und für 10 min inkubiert, damit sich die Calciumphosphat-DNA-Copräzipitate ausbilden konnten. Das Präzipitat und 10 µl 10 mM Chloroquin pro ml Medium wurden dann zu den Zellen gegeben und diese für 4-16 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das DNA-haltige Medium abgesaugt, durch frisches DMEM/F12-Medium ersetzt und die Zellen bis zum Versuchsbeginn oder der Aussaat in 12-Loch-Kulturschalen für die Mikroskopie weiter kultiviert.

Für die Transfektion mittels *Lipofectamine Reagent* wurden HEK-293-Zellen und die glatten Gefäßmuskelzellen A10 auf 35 mm Zellkulturschalen im entsprechendem Medium ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % weiter kultiviert. Am Tag der Transfektion wurde das Medium durch Nährmedium ohne FKS und ohne Antibiotika ersetzt. Bei der Transfektion wurden pro Transfektionsansatz 3 µg Plasmid-DNA in 150 µl Nährmedium ohne FKS und ohne Antibiotika und 7 µl Lipofectamin in 100 µl Nährmedium ohne FKS und ohne Antibiotika verdünnt. Beide Ansätze wurden danach durch Invertieren gemischt, vereint und für 30 min zur Bildung der DNA-Liposomen Komplexe inkubiert. Anschließend wurde zu den Komplexen 250 µl Nährmedium ohne FKS und ohne Antibiotika zugefügt, gemischt

und der Ansatz zu den Zellen gegeben und für 5 h im Brutschrank inkubiert. Dabei betrug das Transfektionsendvolumen pro Schale 1 ml. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium mit den Komplexen abgesaugt, durch frisches Nährmedium ersetzt und die Zellen bis zum Versuchsbeginn weiter kultiviert.

Die Transfektionseffizienz der mit den Epitopen 3xHA- oder FLAG-gekoppelten Proteine wurde durch Immunfluoreszenzfärbung, wie unter Punkt 3.2.4.6. beschrieben, überprüft. Die Transfektion mit *red fluorescent protein* (RFP)-, *green fluorescent protein* (GFP)-, *yellow fluorescent protein* (YFP)- oder *cyan fluorescent protein* (CFP)-gekoppelten Proteinen wurde unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert S100, Zeiss) überprüft.

3.2.3. Nukleinsäure-Analysen

3.2.3.1. Generierung und Klonierung von humanen SphK1-Fragmenten

Die humane GFP-SphK1, die freundlicherweise von Dr. Stuart Pitson (Adelaide, Australien) zur Verfügung gestellt worden war, wurde in den pECFP-C1-Vektor umkloniert und als Vorlage benutzt, um sechs SphK1-Fragmente mit Hilfe von jeweils spezifischen Oligonukleotiden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu synthetisieren. Die spezifischen Oligonukleotide, die für die Generierung der SphK1-Fragmente benutzt wurden, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Nummerierung, zugehörige Oligonukleotide und Größe der generierten humanen SphK1-Fragmente

SphK1-Fragment-Nr.	Bezeichnung F-Oligonukleotid	Bezeichnung R-Oligonukleotid	Größe der SphK1-Fragmente (in bp)
1	F4SK1-CFP-FL	RhSK1-CFP-F1	570
2	F4SK1-CFP-FL	RhSK1-CFP-F2	1050
3	F4SK1-CFP-FL	RhSK1-CFP-F3	1131
4	FhSK1-CFP-F4	R4SK1-CFP-FL	750
5	FhSK1-CFP-F5	R4SK1-CFP-FL	819
6	FhSK1-CFP-F6	R4SK1-CFP-FL	519

Die PCR-Reaktionen wurden, wie unter 3.2.3.2. beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden 2–5 µl der PCR-Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Größe der

Amplifikate überprüft. Danach wurden die amplifizierten SphK1-Fragmente aufgereinigt und mit Hilfe des „*PCR Cloning Kit*“ von Qiagen in den Klonierungsvektor pDrive kloniert. Nach dieser Zwischenklonierung wurden die die SphK1-Fragmente enthaltenden Konstrukte mit den beiden Restriktionsenzymen *HindIII* und *XhoI* restringiert. Die restringierten SphK1-Fragmente wurden, nach gelelektrophoretischer Auftrennung, aus einem Agarosegel extrahiert. Die aufgereinigten SphK1-Fragmente wurden dann mit dem ebenfalls mit *XhoI* und *HindIII* restringierten und dephosphorylierten Vektor pECFP-C1 ligiert und in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Die Konstrukte wurden nach der erfolgreichen Klonierung durch die GATC Biotech AG in Konstanz, Deutschland sequenziert und überprüft.

3.2.3.2. PCR und Aufreinigung von PCR-Produkten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die PCR der „*Ready MixTM Taq PCR Reaction Mix with MgCl₂*“ der Firma Sigma verwendet und alle PCR-Reaktionen wurden mit dem PCR-Gerät Tpersonal von Biometra durchgeführt. Zu ca. 60 ng DNA oder einer gepickten Bakterienkolonie wurden 12,5 μ l 2x *PCR Ready Mix* (0,75 U Taq DNA-Polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001 % Gelatine, 0,2 mM dNTPs, Stabilisatoren), 1 μ l Forward Primer (1 μ M) und 1 μ l Reverse Primer (1 μ M) hinzu pipettiert und mit H₂O auf ein Reaktionsendvolumen von 25 μ l aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte in 25 Zyklen, wobei ein Zyklus aus der Abfolge 1 min bei 94 °C, 1 min bei 50-55 °C und 2 min bei 72 °C bestand. Nach Beendigung der Zyklen erfolgte noch eine abschließende Inkubation für 5 min bei 72 °C.

Um PCR-Produkte aus den Reaktionsansätzen zu isolieren wurde das „*MinEluteTM Reaction Cleanup Kit*“ der Firma Qiagen benutzt. Es wurde das fünffache Volumen (Vol.) des Puffers PBI zum PCR-Ansatz gegeben, gemixt, der Ansatz auf eine MinElute-Säule gegeben und 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Danach wurde die an die Säulenmatrix gebundene DNA mit 750 μ l Puffer PE gewaschen und anschließend mit 30 μ l Puffer EB eluiert.

3.2.3.3. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration der Nukleinsäuren in den DNA-Präparationen wurde sowohl gelelektrophoretisch abgeschätzt als auch photometrisch unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt. Für die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren gilt folgender Richtwert:

DNA (doppelsträngig): 1 Optische Dichte (OD)₂₆₀ = 50 μ g/ml

Damit lässt sich die Konzentration von doppelsträngiger DNA nach folgender Formel berechnen:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Extinktion} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.3.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einer horizontalen Sub-Cell GT Flachbettkammer (Bio Rad).

Verwendete Lösungen:

10x TBE

108 g Tris Base
55 g Borsäure
9,3 g EDTA
pH 8,0
ad 1 l H₂O

6x DNA-Ladepuffer (Fermentas)

10 mM Tris-HCl pH 7,6
60 mM EDTA
0,03 % Bromphenolblau
60 % Glycerol
0,03 % Xylencyanol FF

Für die Gele wurde die entsprechende Menge an Agarose in 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde dann die aufgekochte Agarose noch mit 1:100000 Vol. Sybr Safe versetzt oder das Gel direkt gegossen, wobei im letzteren Fall eine 5-10 minütige Inkubation des Gels in einem Bad von Ethidiumbromidlösung nach dem Gellauf erfolgte. Danach polymerisierte die Agarose für ca. 30 min aus. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ Vol. 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 1 %igen Agarosegel bei 4-6 Volt/cm in 0,5x TBE-Puffer aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch die erhöhte Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bzw. des gebundenen Sybr Safes bei Anregung mit UV-Licht visualisiert und zur Dokumentation fotografiert.

3.2.3.5. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Für die Entfernung der 5'-Phosphatgruppen an den restringierten Vektorenden wurden zu 30 μ l restringierter Vektor-DNA 4 μ l Alkalische Phosphatase, 10 μ l 10x Puffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, pH 9,0) und 56 μ l H₂O gegeben und dieser Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Vektor mit 1 Vol. 5 M Ammoniumacetat und 100 % Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in TE-Puffer rückgelöst.

3.2.3.6. Ligation

Für die Zwischenklonierung der SphK1-Fragmente wurde das Kit „Qiagen PCR Cloning Kit“ (Qiagen) verwendet. Während der vorausgegangenen Amplifikation wurde durch die Taq-

Polymerase den 3'-Enden der DNA ein zusätzlicher Desoxyadenosin-Rest angefügt. Der geschnittene pDrive Vektor ist durch überhängende Uracil-Reste an seinen Enden zur direkten Ligation mit PCR-Produkten befähigt. Die Ligation erfolgte mittels der T₄-DNA-Ligase, welche die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen nebeneinander liegenden 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden in doppelsträngiger DNA katalysiert.

Ligationsansatz:

5 µl 2x Ligation Master Mix
1 µl pDrive Cloning Vector (50 ng)
1-4 µl PCR-Produkt
H₂O ad 10 µl

Die Ligation erfolgte für 2 h bei 16 °C.

Für die Ligationsreaktion, der aus dem pDrive-Vektor ausgeschnittenen SphK1-Fragmente mit dem pECFP-C1-Vektor, wurden 1-2 U T₄-DNA Ligase, und 2 µl des 10x Ligations Puffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8) der Firma Fermentas verwendet. Die eingesetzte DNA-Menge wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Größe des Inserts}}{\text{kb Größe des Vektors}} \times \text{molares Verhältnis von Insert zu Vektor} = \text{ng des Inserts}$$

Die Ligation erfolgte in einem mit H₂O aufgefüllten Endvolumen von 20 µl bei 16 °C über Nacht.

3.2.3.7. Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine 10 ml-Vorkultur einer *E. coli* DH5α Einzelkolonie über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml der Vorkultur inokuliert und die Zellen bis zu einer OD von 0,4 bis 0,6 angezogen. Die Kultur wurde für 30 min abgekühlt und anschließend für 5 min bei 4000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 150 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert, erneut abzentrifugiert, in 8 ml 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und 1 h auf Eis inkubiert. 8 ml einer 50 mM CaCl₂-Lösung in 40 %igen Glycerol wurden dann zu den Zellen gegeben und 200 µl Aliquots der Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Bei der Transformation wurden die Ligationsansätze bzw. bis zu 1 µg Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben und der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C wurde der Transformationsansatz sofort wieder für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 1 ml S.O.C.-Medium (Invitrogen) hinzugegeben und

der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 200 rpm in einen Schüttelinkubator gestellt. Die *E.coli*-Zellen wurden für 1 min bei 115000 rpm in der Biofuge (Heraeus) pelletiert, in 100 µl S.O.C.-Medium aufgenommen und 30-100 µl der Bakterienkultur wurden auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung der Agarplatten wurden 32 g LB-Agar in 1 l Wasser gegeben und autoklaviert. Nach einer Abkühlung wurde das entsprechende Antibiotikum (50-100 µg/ml) zugegeben und das flüssige Agar auf 10 cm Zellkulturschalen verteilt. Für eine Blau-Weiß-Selektion wurden zusätzlich zu 1 l LB-Agar noch 2 ml X-gal (40 mg/ml in Dimethylformamid) und 500 µl 100 mM IPTG hinzugefügt.

3.2.3.8. Detektion positiver Klone und Plasmid-Präparationen

Zur Detektion positiver Klone wurden Plasmid-Minipräparationen bzw. Kontroll-PCRs durchgeführt. Die Minipräparation von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der Pufferlösungen des „*Plasmid Mega Kit*“ (Qiagen) nach modifiziertem Protokoll durchgeführt, wobei die DNA nicht über Silikagelsäuren gereinigt wurde. Dazu wurden 3 ml mit entsprechendem Antibiotikum (100 µg/ml) versetztes LB-Medium mit einer *E. coli* Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1,5 ml der Schüttelkultur wurde für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert, das Sediment in Puffer P1 resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Puffer P2 für 5 min inkubiert. Danach wurden 200 µl Puffer P3 zum Ansatz gegeben, für 5 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt, für 5 min inkubiert und erneut zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde für 30 min an der Luft getrocknet und in 30 µl H₂O gelöst. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend restringiert und in einem Agarose-Gel aufgetrennt, um die Größe der DNA zu kontrollieren.

Bei der Kontroll-PCR wurden zuvor gesicherte Einzelkolonien mit einer Pipettenspitze direkt von der Agarplatte gepickt, mit einem PCR-Ansatz vermischt und eine PCR, wie bei 3.2.3.2. beschrieben, durchgeführt. 7 µl der PCR-Ansätze wurden dann in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt. Die Kolonien, die Fragmente der richtigen Größe enthielten, wurden weiter in den CFP-Vektor kloniert oder sequenziert.

Für die Präparation von großen Mengen Plasmid-DNA wurde das Kit „*Plasmid Mega Kit*“ oder „*EndoFree™ Plasmid Mega Kit*“ (Qiagen) verwendet. Dafür wurde eine mit dem entsprechendem Antibiotikum (100 µg/ml) versetzte 3 ml Vorkultur einer Einzelkolonie über Nacht bei 37 °C vermehrt und mit dieser dann 1,5 l Antibiotika-haltiges (100 µg/ml) LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte nach

Angaben des vom Hersteller mitgelieferten Protokolls. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

3.2.3.9. DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Hilfe von bakteriellen Restriktionsendonukleasen des Typs II, nach den vom Hersteller vorgegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen.

Analytische Spaltungen wurden, je nach DNA-Menge, in einem Endvolumen von 10-50 µl durchgeführt und es wurden pro 1 µg doppelsträngige DNA, 2 *Units* (U) Enzym eingesetzt. Die Inkubationszeit im Temperaturoptimum der Restriktionsenzyme betrug 3-4 h. Bei der Restriktion von größeren DNA-Mengen wurde der Ansatz über Nacht im Temperaturoptimum inkubiert.

3.2.3.10. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurden die Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ (Qiagen) aufgereinigt. Zu einem Vol. Gel wurden 3 Vol. Puffer QG pipettiert und das Reaktionsgefäß für 10 min bei 50 °C inkubiert, wodurch sich das Agarosegelstück aufgelöst hatte. Anschließend wurde 1 Vol. Isopropanol hinzugegeben, die Probe gemischt und der Ansatz auf die *QIAquick spin* Säule gegeben. Diese wurde 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Es wurden 500 µl Puffer QG auf die Säule gegeben und nochmals 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Zum Waschen der DNA wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule pipettiert und erneut zentrifugiert. Die getrocknete Säule wurde auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die gebundene DNA wurde mit 30 µl EB-Puffer durch Zentrifugation für 1 min bei 16000 x g eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.3.11. Phenol/Chloroform-Extraktion

Zu der DNA-Probe wurde ein Vol. Phenol gegeben und die Probe gut durchmischt, bis sich eine Emulsion gebildet hatte. Die Probe wurde dann für 5 min bei 9000 x g zentrifugiert. Die DNA-haltige Phase wurde zweimal mit einem Vol. Chloroform versetzt und erneut extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die wässrige, DNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gefällt.

3.2.3.12. Fällung von Nukleinsäuren

Gelöste DNA wurde zur Konzentrierung oder weiteren Reinigung mit Ethanol ausgefällt. Die DNA-Probe wurde mit 2,5 Vol. Ethanol (96 %) und mit 0,1 Vol. 4 M Lithiumchlorid versetzt, für mindestens 1 h bei -80 °C inkubiert und anschließend für 15 min bei 9000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Nukleinsäurepellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden an der Luft getrocknet und in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

3.2.4. Protein-Analysen

3.2.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Verwendete Lösungen:

Bradford-Reagenz:

400 mg Brillant-Blau G 250
250 ml Ethanol
250 ml Phosphorsäure (85 %)
ad 1 l H₂O

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford. Es wurden 990 µl einer zuvor erstellten 1:5 Verdünnung des Bradford-Reagenzes mit 10 µl des Proteinextraktes versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen. Durch den Vergleich mit einer BSA-Standardgeraden, welche mit definierten BSA-Konzentrationen erstellt wurde (0,4–2 mg/ml Protein), konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

3.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot-Analyse

Proteine wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülmassen mittels vertikaler, diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

Verwendete Lösungen:

3x Laemmli-Ladepuffer

20 % β -Mercaptoethanol (v/v)
6,6 % SDS (w/v)
33 % Glycerol (v/v)
200 mM Tris-HCl pH 7,5
0,015 % Bromphenolblau

Tris-Glycin Elektrophoresepuffer

1,92 M Glycin
25 mM Tris
1 % SDS (w/v)

2x Trenngelpuffer

0,2 % SDS (m/v)
750 mM Tris
pH 8,8

2x Sammelgelpuffer

0,2 % SDS (m/v)
250 mM Tris
pH 6,8

Für die Gele wurden Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30:0,8 eingesetzt und es wurden 6 % Sammelgele und 12,5 % Trenngele verwendet.

12,5 % Trenngel

2,1 ml H₂O
10,4 ml 30 % Acrylamid
12,5 ml 2x Trenngelpuffer
100 μ l 10 % APS (w/v)
50 μ l TEMED

6 % Sammelgel

2,8 ml H₂O
2 ml 30 % Acrylamid
5 ml 2x Sammelgelpuffer
100 μ l 10 % APS (w/v)
10 μ l TEMED

Die Proteinproben wurden mit $\frac{1}{3}$ Vol. des 3x Lämmli-Ladepuffers versetzt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und aufs Gel aufgetragen. Als Marker dienten die Standards „Molecular Weight Marker“ (HMW + LMW) (Sigma). Die Elektrophorese wurde bei 36 mA pro Gel für ca. 4 h durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

Ponceau S

0,1 % Ponceau S (w/v)
5 % Essigsäure (v/v)

TBS

150 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
pH 7,4

Western-Transferpuffer

300 mM Glycin
40 mM Tris
0,01 % SDS (w/v)
20 % Methanol (v/v)

Blocking-Reagenz

TBS mit 5 % Magermilchpulver

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden bei einer Stromstärke von 100 mA für 24 h bei 4 °C in Western-Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Transfereffizienz wurde durch eine dreiminütige Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S überprüft. Zur Identifikation der transferierten Proteine wurde die Immunodetektion verwendet. Die unspezifischen Bindestellen auf der Membran wurden zunächst durch eine einstündige Inkubation der Membran im Blocking-Reagenz abgesättigt.

Danach wurde die Membran für 15 min in TBS gewaschen und mit dem entsprechenden Primär-Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Antikörper wurden in TBS mit 0,1 % BSA (m/v) gemäß den Herstellerangaben verdünnt. Nachdem die Membran zweimal für 15 min in TBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern (Verdünnung gemäß der Herstellerangaben in TBS mit 0,1 % BSA m/v) für 1 h bei Raumtemperatur. Auf die Inkubation mit dem sekundären Antikörper folgten wiederum drei Waschschriffe von je 15 min mit TBS. Der Nachweis der Protein-gebundenen Antikörper erfolgte mit dem „*Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus*“ (PerkinElmer). Die 1:1 Lösung aus ECL Reagenz 1 und 2 wurde gleichmäßig auf der Nitrocellulosemembran verteilt und 1 min inkubiert. Die anschließende Detektion erfolgte mit BioMax XAR Filmen.

3.2.4.3. Entfernung der Antikörper von Nitrocellulosemembranen

Verwendete Lösungen:

Puffer I

10 mM Tris-HCl pH 8,8
1 % SDS
10 mM β -Mercaptoethanol

Puffer II

100 mM Natriumcitrat pH 3,0
10 mM β -Mercaptoethanol
1 % SDS

TBS

150 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
pH 7,4

Die Membran wurde für 1 h in Puffer I inkubiert und dreimal für 5 min in TBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Membran für 1 h in Puffer II. Die Membran wurde sechsmal für 10 min in TBS gewaschen. Die vollständige Entfernung der Antikörper wurde mit dem „Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus“ (PerkinElmer) überprüft und die Membran anschließend für eine erneute Immunodetektion eingesetzt.

3.2.4.4. Coimmunopräzipitation

Verwendete Lösungen:

TBS

10 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl

Immunopräzipitationspuffer

10 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
1 mM EGTA
1 mM PMSF
10 µg/ml Leupeptin
50 µg/ml Aprotinin
0,1 % Triton X-100

Ziel war es, eine direkte Interaktion zwischen der SphK1 und dem Protein $G\alpha_q$ nachzuweisen. Dafür wurden auf 35 mm Schälchen kultivierte HEK-293-Zellen sowohl mit der YFP-gekoppelten SphK1 und dem Glu-Glu-gekoppelten konstitutiv aktiven G-Protein $G\alpha_q^{Q209}$ als auch mit dem pEYFP-Vektor und dem Glu-Glu-gekoppelten konstitutiv aktiven G-Protein $G\alpha_q^{Q209L}$ cotransfiziert. In der Nacht vor Versuchsbeginn wurden die transfizierten Zellen im DMEM/F12-Medium ohne FKS inkubiert. Die Zellen wurden zu Beginn auf Eis gestellt, zweimal mit 1 ml eiskaltem TBS gewaschen und für 20 min mit je 600 µl Immunopräzipitationspuffer auf Eis inkubiert und lysiert. Die Zellen wurden danach vom Schälchenboden abgekratzt, dreimal durch eine 0,5 x 25 mm Kanüle auf- und abgezogen und wieder für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen für 10 min bei 26000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration, wie unter 3.2.4.1. beschrieben, bestimmt. Zu je 300 µg der Überstände wurden entweder der anti-YFP Living Colors Antikörper (BD Biosciences, 1:200 verdünnt in TBS) oder der anti-Glu-Glu Antikörper (Covance, 1:150 verdünnt in TBS) gegeben und für 1 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (Heidolph) inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Protein-A Sepharose-Beads entsprechend den Herstellerangaben gewaschen und mit Immunopräzipitationspuffer äquillibriert. Zu den mit Antikörpern versetzten Proben wurden je 40 µl gut aufgeschüttelte Protein-A Sepharose

hinzugegeben und für 4 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Protein-Sepharose-Präzipitate dreimal mit je 300 µl kaltem Immunopräzipitationspuffer gewaschen, mit 150 µl 1x Lämmli-Ladepuffer versetzt und die gebundenen Proteine für 5 min bei 95 °C eluiert. Die präzipitierten Proteine wurden auf ein 12 % Polyacrylamidgel aufgetragen und eine SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblotting durchgeführt. Die auf die Nitrocellulosemembranen transferierten Proteine wurden dann mit den laut Herstellerangaben entsprechend verdünnten Primär-Antikörpern, anti-Gα_{q/11}-Antikörper (Gramsch Laboratories), anti-YFP Living Colors Antikörper (BD Biosciences) oder anti-Glu-Glu Antikörper (Covance) und dem Sekundär-Antikörper anti-Kaninchen IgG/Peroxidase-Konjugat (Sigma, 1:5000 verdünnt in TBS), wie unter 3.2.4.2. beschrieben, immunodetektiert.

3.2.4.5. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Für die Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ nach der Methode von Grynkiewicz *et al.* (1985) wurde das Spektrofluorometer Hitachi 2500 und der Ca^{2+} -Chelator Fura-2/AM benutzt. Die Zellen wurden je nach Zellart, mit oder ohne Trypsin-Vorbehandlung, mit HBSS von den Zellkulturschalen abgelöst und für 1 h mit 1 µM Fura-2/AM in HBSS bei 37 °C im Dunkeln beladen. Fura-2/AM ist dabei zellpermeabel und wird nach Aufnahme in die Zellen intrazellulär durch unspezifische Esterasen gespalten, wodurch sich freies Fura-2 anreichert. Nach der Inkubation wurde das überschüssige Fura-2/AM durch zweimaliges Waschen mit HBSS entfernt, die Zellen in HBSS resuspendiert und für die Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ verwendet. Fura-2 wirkt als Chelator, der intrazelluläres Ca^{2+} bindet, wobei eine Ca^{2+} -induzierte Verschiebung des Exzitationsspektrums bei einem gleich bleibenden Emissionsmaximum von 510 nm auftritt. In Abhängigkeit davon, ob ein Ca^{2+} -Fura-2-Komplex vorliegt oder ob Fura-2 ungebunden ist, verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 340 nm (Ca^{2+} -Fura-2-Komplex) auf 380 nm (Fura-2 ungebunden).

Während der Messungen wechselte die Exzitationswellenlänge alle 500 ms zwischen 340 nm und 380 nm. Nach Aufnahme einer stabilen Basislinie erfolgte die Stimulation der Zellen mit den verschiedenen Agonisten. Zur Bestimmung der maximalen Emission von Fura-2 in der Ca^{2+} -gebundenen Form wurden die Zellen mit 0,03 % Digitonin permeabilisiert. Danach wurde das freie Ca^{2+} mit 15 mM EGTA komplexiert und so das Emissionsmaximum der Ca^{2+} -freien Form des Fura-2 ermittelt.

Bei den $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen in der Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} wurden die Zellen im HBSS ohne Ca^{2+} resuspendiert und zu Beginn der Messung mit 50 μ M EGTA versetzt. Vor der Bestimmung der Emissionsmaxima der Ca^{2+} gebundenen und freien Form des Fura-2 wurde 1 mM $CaCl_2$ zu den Zellen gegeben.

Aus den Emissionsverhältnissen wird die $[Ca^{2+}]_i$ nach der Ratio-Methode mittels folgender Formel berechnet:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d(R_t - R_{min}) / (R_{max} - R_t) / (R_{max} - R_t) F_{min380} / F_{max380}$$

$[Ca^{2+}]_i$ = intrazelluläre Konzentration an freiem Ca^{2+}

K_d = 224 nM (Dissoziationskonstante von Fura-2 für Ca^{2+})

R_t = F_{340} / F_{380} zum Zeitpunkt t

R_{max} = $F_{340\ max} / F_{380\ max}$ bei maximaler $[Ca^{2+}]_i$

R_{min} = $F_{340\ min} / F_{380\ min}$ bei minimaler $[Ca^{2+}]_i$

$F_{max\ 380}$ = Emission nach Anregung bei $\lambda = 380$ nm und bei maximaler $[Ca^{2+}]_i$

$F_{min\ 380}$ = Emission nach Anregung bei $\lambda = 380$ nm und bei minimaler $[Ca^{2+}]_i$

3.2.4.6. Immunfluoreszenzfärbung

Hierfür wurden die Konstrukte der $S1P_1$ -Rezeptormutanten $S1P_1^{R292A}$, $S1P_1^{K111A}$ und die $S1P_2$ und $S1P_3$ -Rezeptoren sowie die $SphK1^{G82D}$ im pcDNA3 bzw. 3.1-Vektor verwendet. Die $S1P_2$ - und $S1P_3$ -Rezeptoren waren mit dem sich wiederholenden HA-Epitop gekoppelt und ließen sich mit einem anti-HA Antikörper (Roche) nachweisen, während die $S1P_1$ -Rezeptormutanten $S1P_1^{R292A}$, $S1P_1^{K111A}$ und die $SphK1^{G82D}$ mit einem FLAG-Epitop gekoppelt waren und mit anti-FLAG Antikörper (Stratagene) angefärbt werden konnten. Zur Vorbereitung wurden HEK-293-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und auf mit 0,00125 % Poly-L-Lysin vorbeschichteten, mikroskopischen Deckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten kultiviert.

Zu Beginn wurden die Zellen zweimal mit 37 °C warmen PBS gewaschen und dann für 1 h auf Eis mit einer eiskalten 4 % Paraformaldehyd-Lösung pH 7,5 in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 4 °C kaltem PBS wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 4 min bei -20 °C permeabilisiert, erneut zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h mit 5 % Milchpulver in DPBS bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen des Milchpulvers wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (Verdünnung in DPBS/BSA 0,1 % gemäß der

Herstellerangaben) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 37 °C warmen DPBS gewaschen und für 1 h im Dunkeln mit dem entsprechenden, farbstoffgekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung in DPBS/BSA 0,1 % gemäß der Herstellerangaben) inkubiert. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden dann, entweder aus der 12-Loch-Kulturplatte genommen, im Dunkeln getrocknet und mit je 10 µl Mowiol eingedeckt oder mit je 1 ml HBSS pro Loch in der 12-Loch-Kulturschale versetzt. Die Lokalisation der Proteine wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM510; 63x/1.4 Plan-Apochromat Objektiv oder Leica TCS SP2, HCX PLAPO 40 x 1.25 OIL UV Objektiv) untersucht. Die Anregung erfolgte mit Hilfe eines Argonlasers bei einer Wellenlänge von 488 nm und die Emission wurde mit einem Langpassfilter bei Wellenlängen oberhalb von 505 nm detektiert. Die aufgezeichneten Bilder wurden mit dem LSM 5 Image Browser Programm der Firma Zeiss bearbeitet. Bei weiteren Experimenten wurde die Colokalisierung der SphK1^{G82D} mit dem GFP-gekoppelten S1P₁-Rezeptor untersucht. Dazu wurden HEK-293-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten cotransfiziert und die SphK1^{G82D} mit dem fluoreszierenden Primärantikörper anti-FLAG-M2-Cy3 Antikörper, wie oben beschrieben, immungefärbt.

Die Überprüfung der Colokalisierung erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop, wobei die Fluoreszenzen der beiden Proteine in voneinander separaten Kanälen im Multikanalmodus untersucht wurden. Die Anregung der GFP-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe eines Argonlasers bei einer Wellenlänge von 488 nm und deren Emission wurde mit einem Langpassfilter bei Wellenlängen oberhalb von 505 nm detektiert, während die SphK1^{G82D} mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 543 nm angeregt und deren Emission mit einem Langpassfilter oberhalb von 560 nm detektiert wurde.

3.2.4.7. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Für die durchgeführten Untersuchungen der subzellulären Lokalisation in lebenden und fixierten Zellen wurden die mit den Fluoreszenzproteinen YFP-, CFP- oder GFP-gekoppelten SphK1-Konstrukte, die GFP-gekoppelte SphK1^{S225A}, die GFP-gekoppelten SphK1-Fragmente SphK1¹⁻¹⁶⁹ und SphK1¹³⁴⁻³⁸⁸, die generierten CFP-gekoppelten SphK1-Fragmente 1-6, die RFP-gekoppelte PKD und die CFP-gekoppelte PKC α , sowie das S1P₁-GFP Fusionsprotein verwendet. Die transfizierten Zellen wurden auf mit 0,00125 % Poly-L-Lysin vorbeschichteten, mikroskopischen Deckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten kultiviert. Zur Überprüfung der Lokalisation an fixierten Zellen wurden die Zellen für die angegebenen

Zeiten mit verschiedenen Stimuli in den Vertiefungen der 12-Loch-Kulturplatten in DMEM/F12-Medium ohne FKS inkubiert. Danach wurden die Zellen, wie unter 3.2.4.6. beschrieben, mit Paraformaldehyd fixiert und die Fluoreszenz der Farbstoff-gekoppelten Proteine mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM510; 63x/1.4 Plan-Apochromat Objektiv oder Leica TCS SP2, HCX PLAPO 40 x 1.25 OIL UV Objektiv) beobachtet.

Bei Untersuchungen an lebenden Zellen wurden diese mit HBSS gewaschen, die mikroskopischen Deckgläschen in Mikroskopiekammern eingesetzt und mit verschiedenen Stimuli für den angegebenen Zeitraum in HBSS inkubiert. Die Fluoreszenz der Proteine wurde an einem der oben beschriebenen Laserscanning-Mikroskopen untersucht. Die Anregung der YFP- und GFP-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe eines Argonlasers bei einer Wellenlänge von 488 nm und deren Emission wurde mit einem Langpassfilter bei Wellenlängen oberhalb von 505 nm detektiert. Die CFP-gekoppelten Proteine wurden bei 458 nm mit einem Argonlaser angeregt, während die Emission mit einem 475 nm Langpassfilter detektiert wurde. Die aufgezeichneten Bilder wurden mit dem LSM 5 Image Browser Programm der Firma Zeiss bearbeitet.

Bei den Untersuchungen der Colokalisation von Proteinen wurden cotransfizierte Fusionsproteine im Multikanal-Modus getrennt voneinander in unterschiedlichen Kanälen eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes gemessen. Die PKD-RFP wurde dabei mit Hilfe eines Helium-Neon-Lasers bei einer Wellenlänge von 543 nm angeregt und die Emission zwischen 560 nm und 615 nm mit einem Bandpassfilter detektiert. Die Anregung und Detektion der cotransfizierten YFP- und GFP-gekoppelten Proteine erfolgte, wie bei der Einzelkanalmessung, mit Hilfe der 488 nm-Linie eines Argonlasers und einem 505 nm Langpassfilter. Bei der Colokalisation der CFP-gekoppelten PKC α mit der YFP-gekoppelten SphK1 erfolgte die Anregung der CFP-gekoppelten PKC α mit einem Argonlaser bei 458 nm, während die Emission zwischen 465-505 nm mit einem Bandpassfilter detektiert wurde. Die YFP-gekoppelte SphK1 wurde mit der 514 nm-Linie eines Argonlasers angeregt und die Emission mit einem Bandpassfilter zwischen 525-600 nm detektiert.

Die Analyse von intrazellulären Ca²⁺-Signalen erfolgte in adhärennten Zellen mit dem fluoreszierenden Ca²⁺-Indikator Fluo-4/AM. Die Zellen wurden auf mikroskopische Deckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten kultiviert und vor dem Versuchstag über Nacht mit DMEM/F12-Medium ohne FKS versetzt. Vor der Messung wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit 2-4 μ M Fluo-4/AM in HBSS für 30 min und bei Raumtemperatur

beladen. Danach wurden die Zellen mit HBSS gewaschen, die Deckgläschen in die Mikroskopiekammern eingespannt und die durch Agonisten induzierten Ca^{2+} -Anstiege mit einem der oben beschriebenen konfokalen Laserscanning-Mikroskope detektiert. Dabei wurde Fluo-4 mit der 488 nm-Linie eines Argonlasers angeregt und die Emission mittels eines 505 nm Langpass-Filters gemessen.

Um die Colokalisierung der Fluo-4 Zellanfärbung mit verschiedenen Kompartiment-spezifischen Farbstoffen bzw. Markern zu analysieren, wurden die Zellen wie oben beschrieben, für die Messungen vorbereitet, mit 4 μM fluo-4/AM und zusätzlich entweder mit 1 μM Tetramethylrhodamin, 500 nM ER Tracker Blue White DPX oder 500 nM Lyso Tracker Red DND 99 für 45 min in HBSS inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder in HBSS gewaschen und die Lokalisation der Farbstoffe mit einem der oben genannten konfokalen Mikroskope betrachtet, wobei beide Farbstoffe separat voneinander im Multi-Kanal-Modus gemessen wurden. Die Fluoreszenz von Fluo-4 in Kombination mit ER Tracker oder Lyso Tracker wurde mit einem Argonlaser bei 488 nM angeregt und die Emission mittels eines 505 nm Langpass-Filters detektiert, während die Emission in Kombination mit Tetramethylrhodamin mit einem 505-530 nm Bandpass-Filter aufgenommen wurde. Die Anregung des Lyso Trackers und des Tetramethylrhodamins erfolgte mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 542 nm und die Emission wurde mit einem 560 nm Langpass-Filter detektiert. Der ER Tracker wurde mit der 364 nm-Linie eines UV-Lasers (Enterprise II, Laser Innovations) angeregt und die Fluoreszenz wurde mit einem 475 nm Langpass-Filter aufgenommen.

3.2.5. Statistische Datenauswertung und Präsentation

Die Tabellen und Grafiken wurden mit dem Programm Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.) erstellt. Die Messwerte sind als Mittelwerte (MW) dargestellt und das Maß der Streuung entweder als \pm Standardabweichung (SD) der Mehrfachbestimmung eines repräsentativen Experiments oder als \pm Standardfehler (SEM) mehrerer unabhängiger Experimente angegeben. Die jeweils verwendeten Methoden zur statistischen Auswertung sind in den Legenden der Abbildungen angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Mechanismus der durch den M₃-Rezeptor induzierten SphK1-Translokation in HEK-293-Zellen

Es ist bekannt, dass verschiedene Membranrezeptoren, wie z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (Maceyka *et al.*, 2002), die SphK-Aktivität und damit die intrazelluläre SIP-Produktion stimulieren können.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation G_q-gekoppelter Rezeptoren, wie etwa des M₃-Rezeptors, nicht nur eine Aktivierung der murinen SphK1, sondern auch eine Translokation der im Basalzustand vorwiegend cytosolisch lokalisierten, murinen SphK1 vom Cytosol an die Plasmamembran induziert (Danneberg, 2003). Die Stimulation anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren hatte jedoch keinen Einfluss auf die Lokalisation der murinen SphK1 (Danneberg, 2003). In der Literatur wurde beschrieben, dass für die durch PMA und TNF- α induzierte Translokation der humanen SphK1 eine Phosphorylierung des Ser²²⁵ der humanen SphK1 durch eine ERK-ähnliche Kinase notwendig ist (Pitson *et al.*, 2003). Die Translokation wird durch die Bindung der SphK1 an das in der Membran lokalisierte Phosphatidylserin vermittelt, wobei die Aminosäuren Thr⁵⁴ und Asn⁸⁹ der SphK1 mit dem Phosphatidylserin interagieren und für die Translokation an die Plasmamembran ebenfalls benötigt werden (Stahelin *et al.*, 2005). Der molekulare Mechanismus der durch Carbachol induzierten SphK1-Translokation und ihre funktionelle Bedeutung waren jedoch bisher nicht bekannt und sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter charakterisiert werden.

4.1.1. Subzelluläre Lokalisation und Translokation der humanen SphK1

Wie bereits oben erwähnt, ist die durch Carbachol induzierte Translokation bisher nur für die murine SphK1 untersucht worden. Für die folgenden Untersuchungen stand, neben dieser YFP-gekoppelten murinen SphK1, eine GFP-gekoppelte humane SphK1 zur Verfügung. HEK-293-Zellen, die stabil den M₃-Rezeptor exprimierten und glatte Gefäßmuskelzellen der Linie A10 aus der Ratte wurden mit dieser humanen GFP-SphK1 bzw. der YFP-gekoppelten murinen SphK1 transfiziert. Die SphK1-Lokalisation und Translokation nach Stimulation mit Carbachol wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Wie in Abb. 2 gezeigt, war die humane SphK1, wie die murine YFP-gekoppelte SphK1, in den HEK-293-

Zellen im Basalzustand cytosolisch lokalisiert. Die Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol induzierte eine massive Translokation der humanen GFP-SphK1 vom Cytosol an die Plasmamembran (Abb. 2 A). Die durch Carbachol induzierte Translokation der humanen SphK1 war mit einer deutlichen exponentiellen Abnahme der cytosolischen Fluoreszenzintensität verbunden (Abb. 2 C). Auch in den glatten Gefäßmuskelzellen der Linie A10 konnte eine deutliche Carbachol-induzierte Translokation der murinen SphK1 an die Plasmamembran und vor allem in die Lamellipodien und Peripherie dieser Zellen beobachtet werden (Abb. 2 B).

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung der SphK1 am Ser²²⁵ auch für die durch Carbachol induzierte Translokation notwendig ist. Dafür wurden HEK-293-Zellen mit einer GFP-gekoppelten SphK1^{S225A} transfiziert und die Lokalisation dieser SphK1-Mutante vor und nach Stimulation des M₃-Rezeptors im konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Die SphK1^{S225A} wird aufgrund des Austausches von Serin gegen Alanin an Position 225 nicht durch eine ERK-ähnliche Kinase phosphoryliert. Die Folge dieser Mutation ist, dass die SphK1^{S225A} nicht nach Stimulation mit PMA oder TNF- α an die Plasmamembran transloziert (Pitson *et al.*, 2003). Die GFP-gekoppelte SphK1^{S225A} war im Basalzustand, wie die Wildtyp-SphK1, vorwiegend cytosolisch lokalisiert (Abb. 3 A). Nach Stimulation der Zellen mit Carbachol translozierte die SphK1^{S225A} massiv vom Cytosol an die Plasmamembran (Abb. 3 A). Dabei betrug die Halbwertszeit der SphK1^{S225A}-Translokation $3,3 \pm 1,2$ s und war damit genauso schnell, wie die Wildtyp-SphK1-Translokation, die mit einer Halbwertszeit von $3,3 \pm 1,6$ s translozierte (Abb. 3 C).

Statine inhibieren die Synthese der Isoprenoid-Zwischenprodukte Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat (Goldstein und Brown, 1990). Diese beiden Verbindungen stellen wichtige posttranslationale Modifikatoren einer ganzen Reihe von Proteinen dar, zu denen unter anderem auch heterotrimere G-Proteine und die GTPasen Ras, Rho, Rap und Rab gehören (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). Diese GTPasen werden durch Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat isoprenyliert, was entscheidend für deren intrazelluläre Lokalisation und Aktivierung ist. Es sollte untersucht werden, ob durch die Stimulierung des M₃-Rezeptors mit Carbachol eine Farnesylierung oder Geranylgeranylisierung der SphK1 induziert wird und ob als Folge dessen die SphK1 an die Plasmamembran transloziert. Die durch Carbachol induzierte Translokation der murinen SphK1 wurde jedoch nicht durch die Vorbehandlung der Zellen mit Simvastatin inhibiert (Abb. 4).

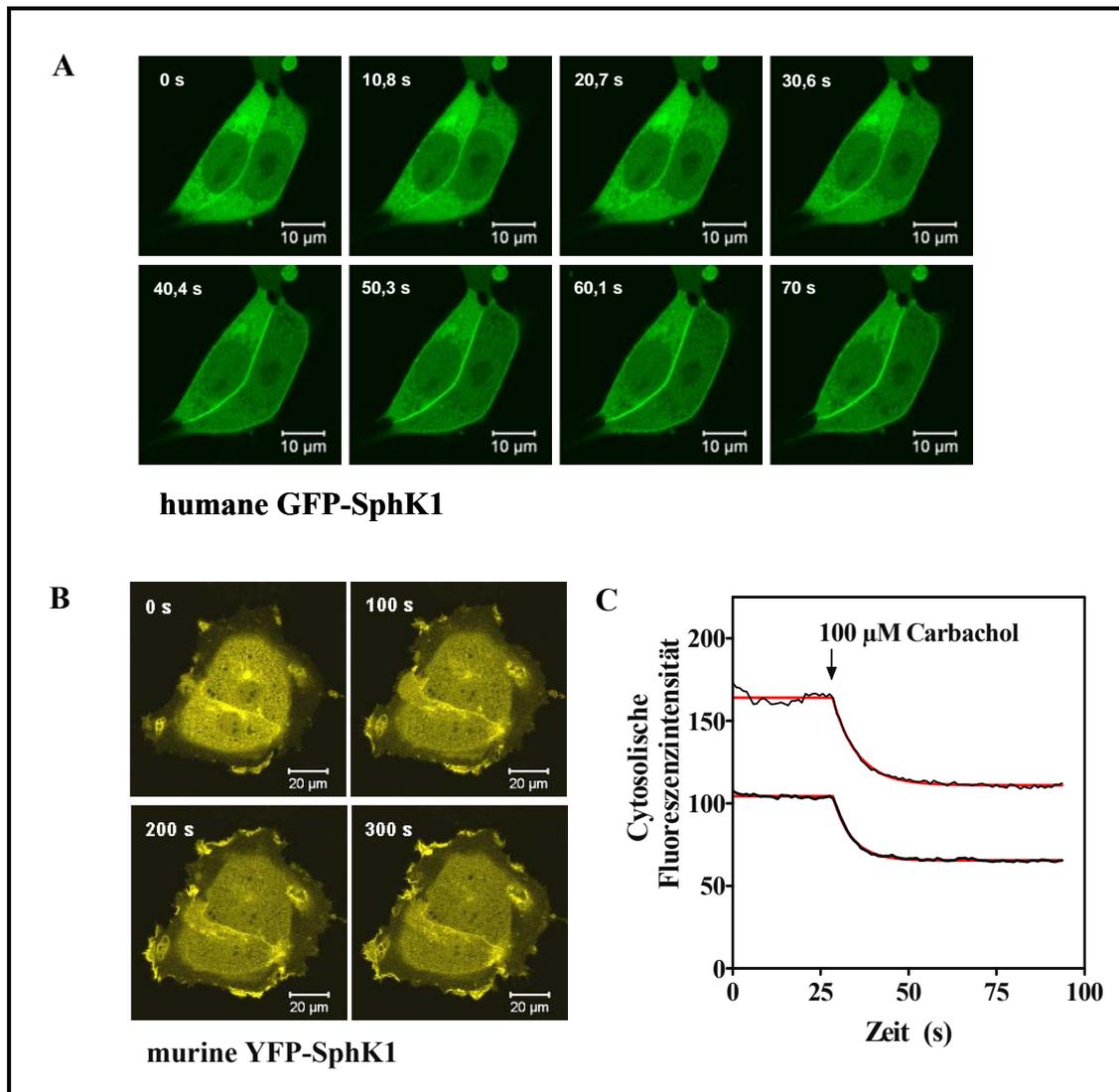


Abb. 2: Durch Carbachol induzierte Translokation der humanen und murinen SphK1 in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen und glatten Gefäßmuskelzellen der Linie A10

HEK-293-Zellen (A) und glatte Gefäßmuskelzellen (B) wurden mit der humanen GFP-SphK1 oder murinen YFP-SphK1 transfiziert. Die in A und B gezeigten Bildserien sind mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommene Zeitverläufe. Die Zeitpunkte sind auf jedem Bild oben links dargestellt und beginnen mit dem Start des Experimentes. Die Stimulation mit 100 μ M Carbachol erfolgte jeweils nach 30 s. C zeigt den Zeitverlauf der cytosolischen Fluoreszenzintensität in HEK-293-Zellen vor und nach Zugabe von Carbachol. Aus den angepassten Exponentialfunktionen (—) wurden die Halbwertszeiten der Translokationen berechnet, die in Abb. 3 C dargestellt sind.

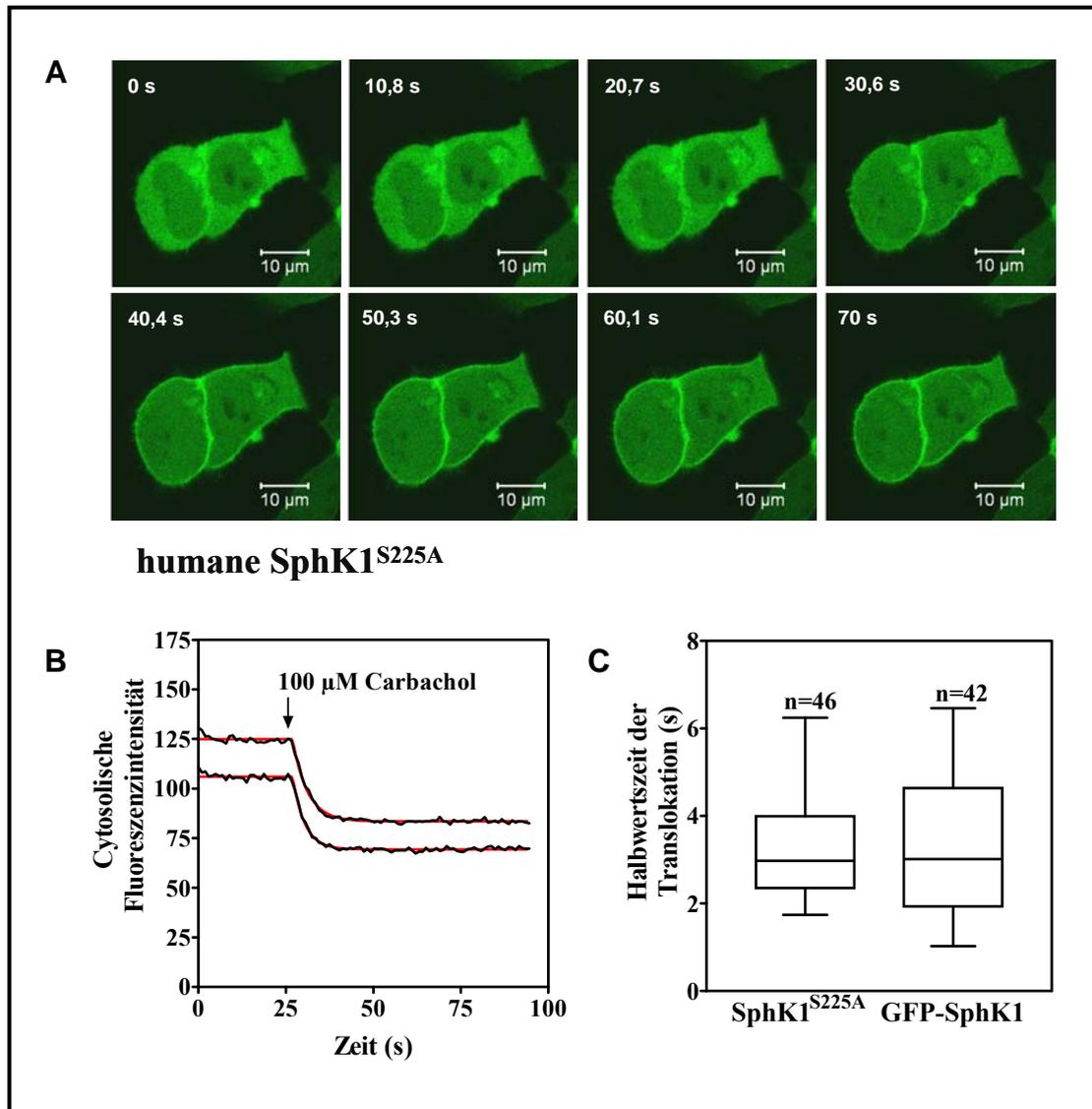


Abb. 3: Zeitverlauf der durch Carbachol induzierten Translokation der humanen SphK1^{S225A} in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit der humanen GFP-SphK1^{S225A} transfiziert. Die in A gezeigte Bildserie ist ein mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommener Zeitverlauf. Die Zeitpunkte sind auf jedem Bild oben links dargestellt und beginnen mit dem Start des Experimentes. Die Stimulation mit 100 μ M Carbachol erfolgte nach 26 s. B zeigt den Zeitverlauf der cytosolischen Fluoreszenzintensität in den in A abgebildeten Zellen, vor und nach Zugabe von Carbachol. Aus den angepassten Exponentialfunktionen (—) wurden die Halbwertszeiten der Translokationen berechnet und im Vergleich zu den Halbwertszeiten der GFP-SphK1-Translokationen in C dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD aus der Anzahl n der analysierten Zellen.

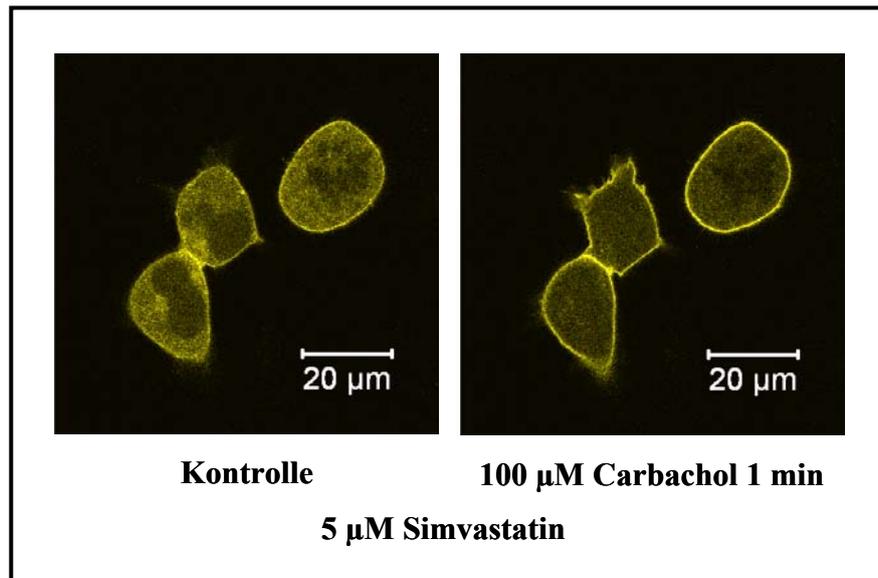


Abb. 4: Einfluss von Simvastatin auf die durch Carbachol induzierte Translokation der murinen SphK1 in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit muriner YFP-SphK1 transfiziert und vor der Messung über Nacht mit 5 μM Simvastatin inkubiert. Die Bilder zeigen mit Simvastatin vorbehandelte Zellen vor und nach der Stimulation mit 100 μM Carbachol.

4.1.2. Vergleich der durch Carbachol induzierten Translokation der SphK1 mit der Translokation anderer Signalmoleküle

Die Stimulation der SphK1-Translokation durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren war spezifisch für G_q-gekoppelte Rezeptoren. Diese induzieren eine Aktivierung von PLC und die Produktion von Diacylglycerol (DAG) und IP₃, welche zur Aktivierung von PKC und Mobilisierung von Ca²⁺ führen. Hierdurch wird unter anderem eine Translokation von Proteinen mit DAG-bindenden Domänen ausgelöst, wozu z. B. PKC-Isoformen und Proteinkinase D (PKD) gehören. Um die SphK1-Translokation näher zu charakterisieren, sollte sie mit der Translokation von PKC-Isoformen und PKD verglichen werden.

HEK-293-Zellen wurden mit der YFP-gekoppelten, murinen SphK1 sowie einer RFP-gekoppelten PKD oder einer CFP-gekoppelten PKC α cotransfiziert. Im konfokalen Laserscanning-Mikroskop wurde deren Lokalisation vor und nach Stimulation mit Carbachol miteinander verglichen.

Vor der Stimulation mit Carbachol befand sich die PKC α -CFP, genauso wie die SphK1, vorwiegend im Cytosol der Zellen (Abb. 5). Durch die Stimulation mit Carbachol

translozierten sowohl die SphK1 als auch die PKC α an die Plasmamembran (Abb. 5). Dabei fiel jedoch auf, dass die Translokation der PKC α deutlich schneller verlief. Auch zeigte sich, dass die PKC α -Translokation, im Gegensatz zur langanhaltenden Translokation der SphK1, nur transient war und das Protein nach der Translokation an die Plasmamembran innerhalb von Sekunden wieder ins Cytosol zurück translozierte. Da die PKC α -Translokation Ca²⁺-abhängig ist, konnte die Stimulation der Zellen mit dem Ca²⁺-Ionophor Ionomycin eine erneute Translokation des Proteins an die Plasmamembran induzieren, wobei diese Stimulation keinen Einfluss auf die translozierte SphK1 hatte (Abb. 5).

Die beiden Enzyme PKD und SphK1 waren im Basalzustand der Zellen vorwiegend im Cytosol lokalisiert (Abb. 6). Beide Proteine translozierten nach der Zugabe von Carbachol an die Plasmamembran der Zellen (Abb. 6). Die Halbwertszeit der PKD-Translokation war sehr variabel und betrug im Durchschnitt $12 \pm 6,6$ s während die Halbwertszeit der murinen SphK1 $3,3 \pm 1,3$ s betrug (Abb. 6). Die G_q-stimulierte PKD-Translokation war, wie die SphK1-Translokation, ebenfalls lang anhaltend. Damit konnte gezeigt werden, dass der Verlauf und die Kinetik der durch Carbachol induzierten PKD- und SphK1-Translokation sehr ähnlich verliefen, während sich die durch Carbachol induzierte Translokation der PKC α deutlich von der SphK1-Translokation unterschied.

Die PKD-Translokation ist abhängig von der Bindung an DAG und der Aktivierung durch die PKC. Um dies zu überprüfen wurden HEK-293-Zellen mit der PKD-RFP transfiziert und die Lokalisation vor und nach Stimulation mit PMA untersucht. Durch Stimulation mit PMA translozierte die cytosolische PKD massiv an die Plasmamembran der Zellen (Abb. 7). Die Halbwertszeit der PKD-Translokation betrug $19,2 \pm 3,7$ s (Abb. 7).

In der Literatur ist beschrieben, dass die in HEK-293-Zellen überexprimierte humane SphK1 nach Stimulation mit PMA ebenfalls vom Cytosol an die Plasmamembran transloziert (Pitson *et al.*, 2003). Im Vergleich zu der durch Carbachol induzierten SphK1-Translokation war jedoch die durch PMA stimulierte Translokation der humanen und murinen SphK1 sehr schwach ausgeprägt und nur an den Zell-Zell-Kontakten gut erkennbar (Abb. 8). Die anschließende Stimulation mit Carbachol löste, auch nach der Stimulation mit PMA, noch eine massive und rasche Translokation der SphK1 aus und verstärkte die PMA-induzierte Translokation (Abb. 8 A). Auch die kombinierte Stimulation mit PMA und dem Ca²⁺-Ionophor Ionomycin, induzierte nur eine sehr schwache Translokation der murinen und humanen SphK1 und hatte keinen Einfluss auf die anschließend durch Carbachol induzierte massive SphK1-Translokation (Abb. 8 B).

Damit waren der Verlauf, die Kinetik und die Intensität der durch PMA induzierten PKD- und SphK1-Translokation unterschiedlich voneinander.

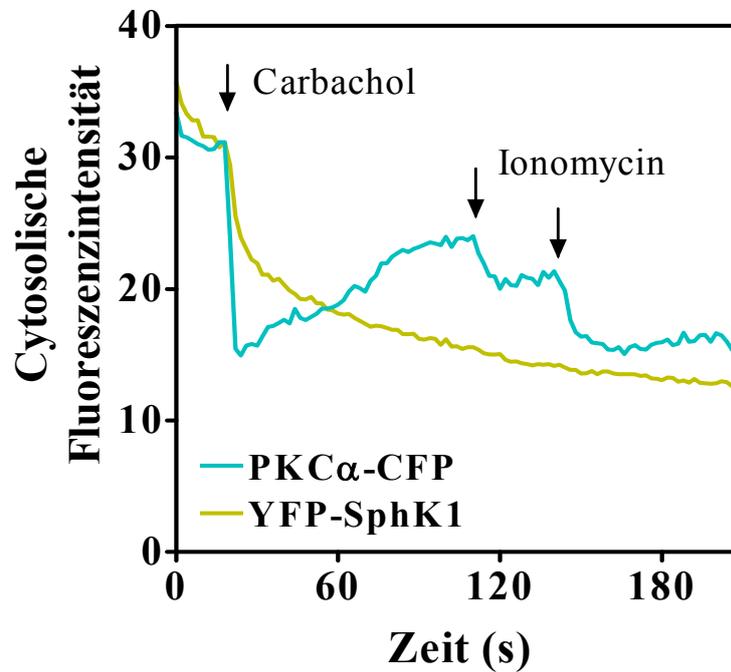


Abb. 5: Zeitverlauf der durch Carbachol induzierten Cotranslokation der murinen SphK1 und der PKC α

Die Zellen wurden mit muriner YFP-SphK1 und PKC α -CFP cotransfiziert. Am dritten Tag nach der Transfektion wurde die Translokation der SphK1 und der PKC α getrennt voneinander im Multikanal-Modus eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes aufgenommen. Nach den jeweiligen Messreihen wurde der Zeitverlauf der cytosolischen Fluoreszenzintensität in den Einzelzellen bestimmt. Die Pfeile weisen auf die Zeitpunkte der Zugabe der Stimulantien hin.

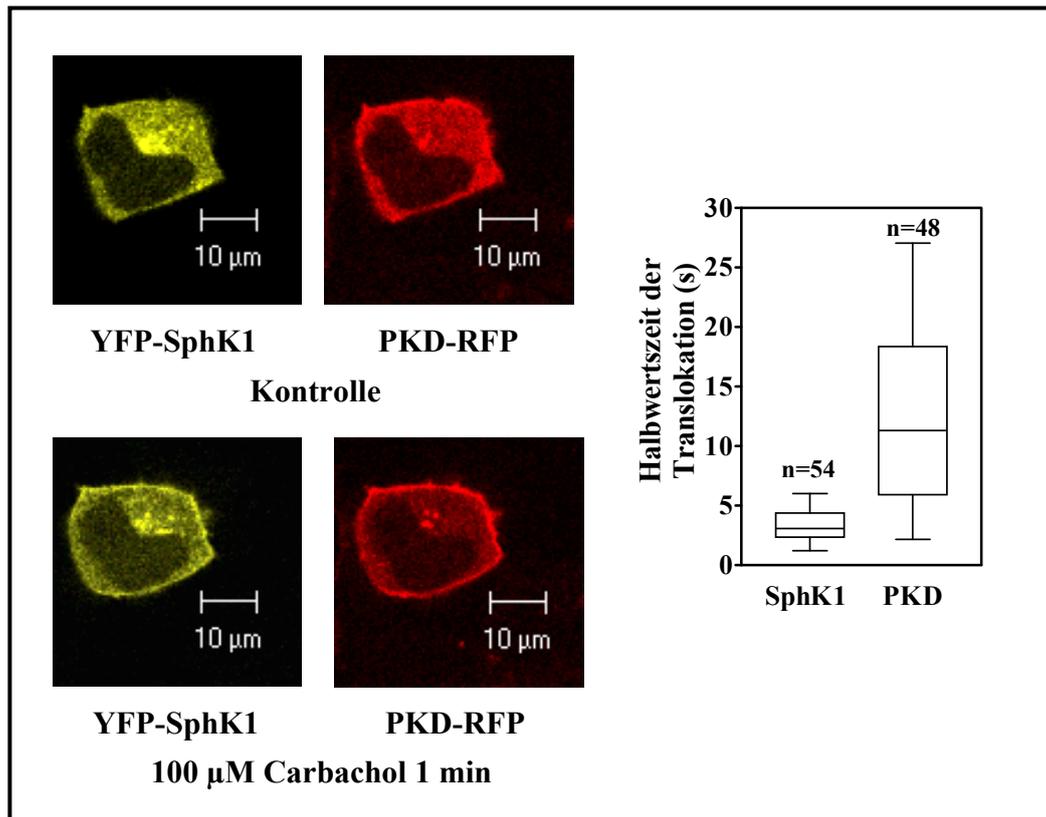


Abb. 6: Zeitverlauf der durch Carbachol induzierten Cotranslokation der murinen YFP-SphK1 und der PKD-RFP

Die Zellen wurden mit muriner YFP-SphK1 und PKD-RFP cotransfiziert. Am dritten Tag nach der Transfektion wurde die Translokation der SphK1 und PKD-RFP getrennt voneinander im Multikanal-Modus eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes aufgenommen. Die Bildserien zeigen cotransfizierte Zellen vor und nach der Stimulation mit 100 μM Carbachol. Die Halbwertszeiten wurden durch Anpassung von Exponentialfunktionen an den Zeitverlauf der cytosolischen Fluoreszenzintensität ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus der Anzahl n analysierter Zellen.

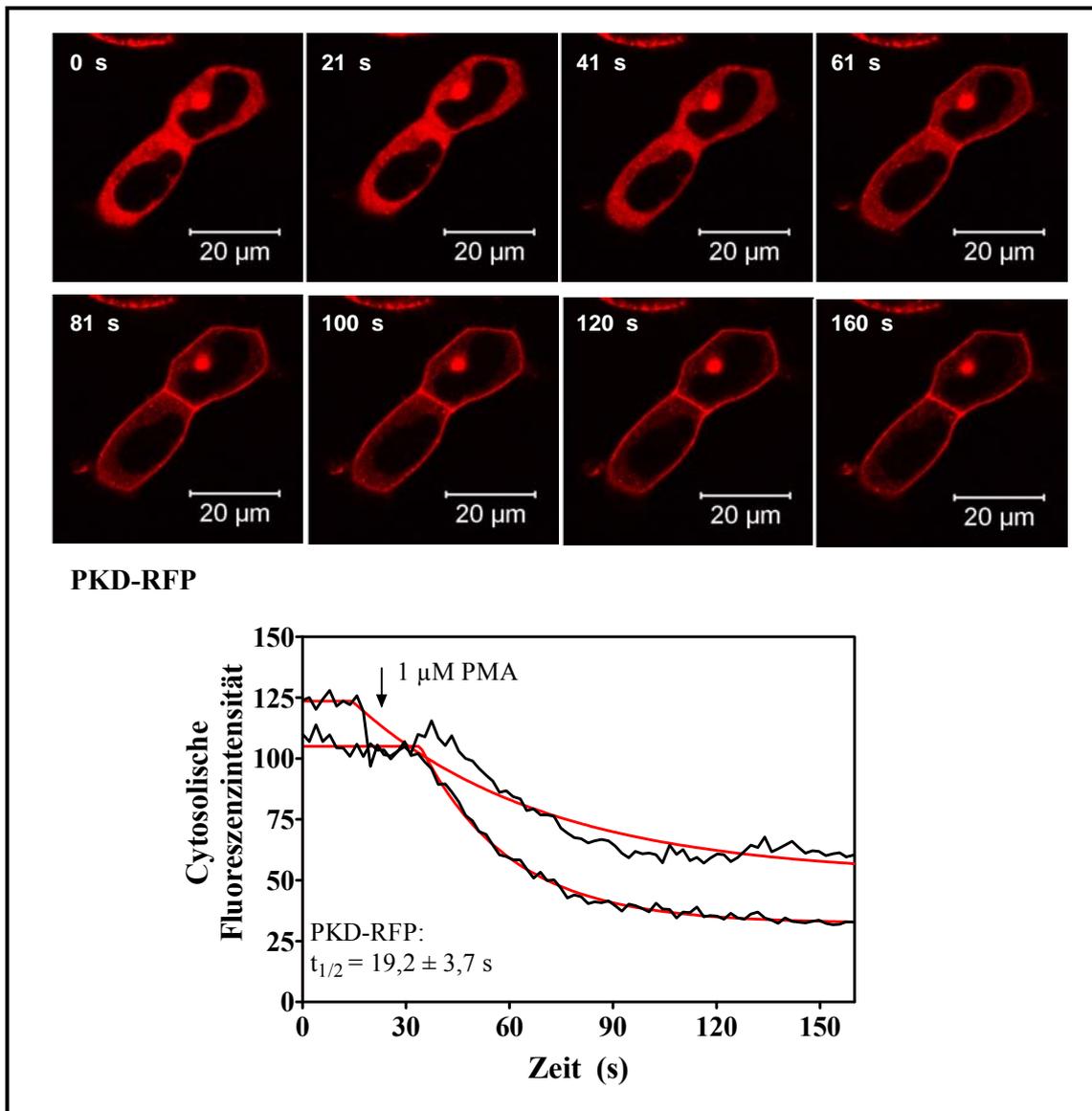


Abb. 7: Zeitverlauf der durch PMA induzierten Translokation der PKD-RFP

Die Zellen wurden mit der PKD-RFP transfiziert. Die Bildserie zeigt mit PKD-RFP transfizierte HEK-293-Zellen vor und nach der Stimulation mit 1 µM PMA. Die Stimulation erfolgte nach 31 s. Die Halbwertszeiten wurden durch Anpassung von Exponentialfunktionen (—) an den Zeitverlauf der cytosolischen Fluoreszenzintensität ermittelt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD aus einem repräsentativen Ergebnis (n=7).

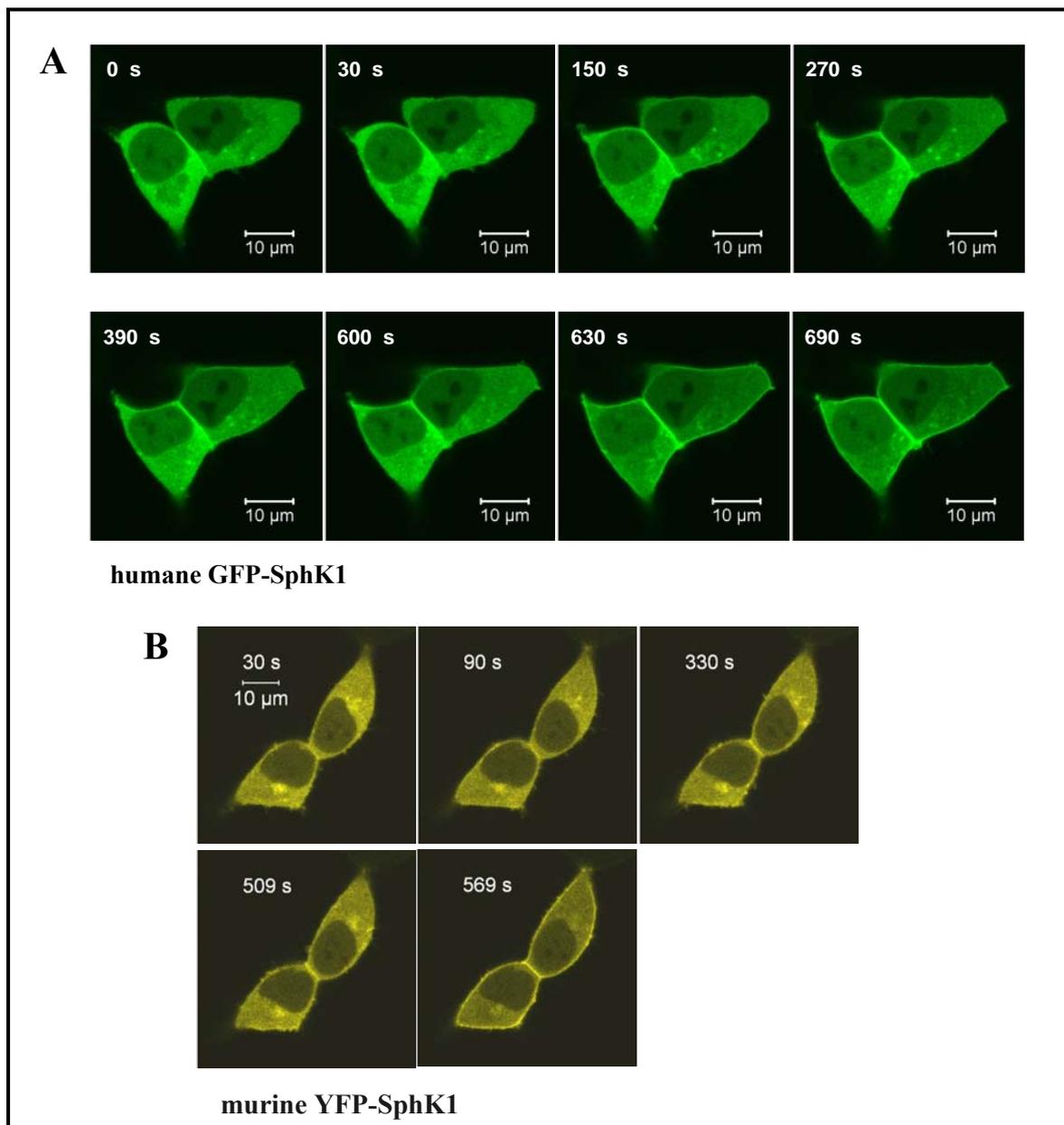


Abb. 8: Zeitverlauf der durch PMA oder durch PMA und Ionomycin induzierten Translokation der SphK1 in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen
 HEK-293-Zellen wurden mit der GFP-SphK1 oder der YFP-SphK1 transfiziert. Die gezeigten Bildserien sind mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommene Zeitverläufe. Die Zeitpunkte sind auf jedem Bild oben links dargestellt und beginnen mit dem Start des Experimentes. A: Die Stimulation der Zellen mit 1 μM PMA erfolgte nach 30 s und die Stimulation mit 100 μM Carbachol nach 600 s. B: Die Stimulation der Zellen mit 1 μM PMA und 1 μM Ionomycin erfolgte nach 30 s und die Stimulation mit 100 μM Carbachol nach 509 s.

4.1.3. Klonierung und Lokalisation von SphK1-Fragmenten

Da nicht bekannt war, welche Regionen oder Aminosäurereste der SphK1 für die durch Carbachol induzierte Translokation notwendig sind, wurden verschiedene CFP-gekoppelte SphK1-Fragmente generiert. Die humane GFP-SphK1, die freundlicherweise von Dr. Stuart Pitson (Adelaide, Australien) zur Verfügung gestellt worden war, wurde in den pECFP-C1-Vektor umklont und als Vorlage benutzt, um sechs SphK1-Fragmente mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden mittels PCR zu synthetisieren, die dann in den pECFP-C1-Vektor kloniert wurden (Abb. 9 und 10). HEK-293-Zellen wurden mit den SphK1-Fragmenten 1-6 und der CFP-SphK1 transfiziert und ihre Lokalisation vor und nach der Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol im konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

Die CFP-SphK1 verhielt sich wie zuvor für die GFP-SphK1 beschrieben. Der Vergleich mit der Translokation der GFP-SphK1 zeigte keinen signifikanten Unterschied und die Halbwertszeiten der GFP-SphK1-Translokation bzw. der CFP-SphK1-Translokation betragen $3,8 \pm 1$ s bzw. $3,6 \pm 0,9$ s (Abb. 11). Die SphK1-Fragmente 1-5 waren vor der Stimulation mit Carbachol vorwiegend cytosolisch lokalisiert (Abb. 11). Das SphK1-Fragment 6 befand sich nicht nur im Cytosol, sondern war in ca. 90 % der beobachteten Zellen auch im Kern lokalisiert (Abb. 11). Nur das SphK1-Fragment 3 translozierte durch die Stimulation mit Carbachol an die Plasmamembran (Abb. 11). Die Halbwertszeit dieser Translokation betrug $4,2 \pm 1,3$ s und erfolgte damit in der etwa gleichen Geschwindigkeit wie die Translokation der CFP-SphK1, deren Halbwertszeit in dieser Messreihe $4 \pm 1,6$ s betrug (Abb. 11). Die Lokalisation der cytosolischen SphK1-Fragmente 1, 2, 4, 5 und 6 blieb durch die Stimulation mit Carbachol dagegen unbeeinflusst (Abb. 11).

Von der murinen SphK1 waren freundlicherweise die zuvor beschriebenen N- und C-terminalen Fragmente SphK1¹⁻¹⁶⁹ und SphK1¹³⁴⁻³⁸⁸ zur Verfügung gestellt worden. Anhand dieser Fragmente war gezeigt worden, dass bestimmte Regionen in der Nähe des C-Terminus der SphK1 und nicht der die Diacylglycerolkinase-Domäne umfassende N-Terminus des Enzyms für die Phospholipase D (PLD)-abhängige Translokation der murinen SphK1 an intrazelluläre Vesikel benötigt werden (Delon *et al.*, 2004).

Als Nächstes wurde die Lokalisation dieser beiden Fragmente nach Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol in HEK-293-Zellen untersucht. Wie in Abb. 12 gezeigt ist, wurde durch die Stimulation mit Carbachol die cytosolische Lokalisation des N-terminalen

Fragments SphK1¹⁻¹⁶⁹ nicht beeinflusst, während das C-terminale Fragment SphK1¹³⁴⁻³⁸⁸ schwach zur Plasmamembran translozierte.

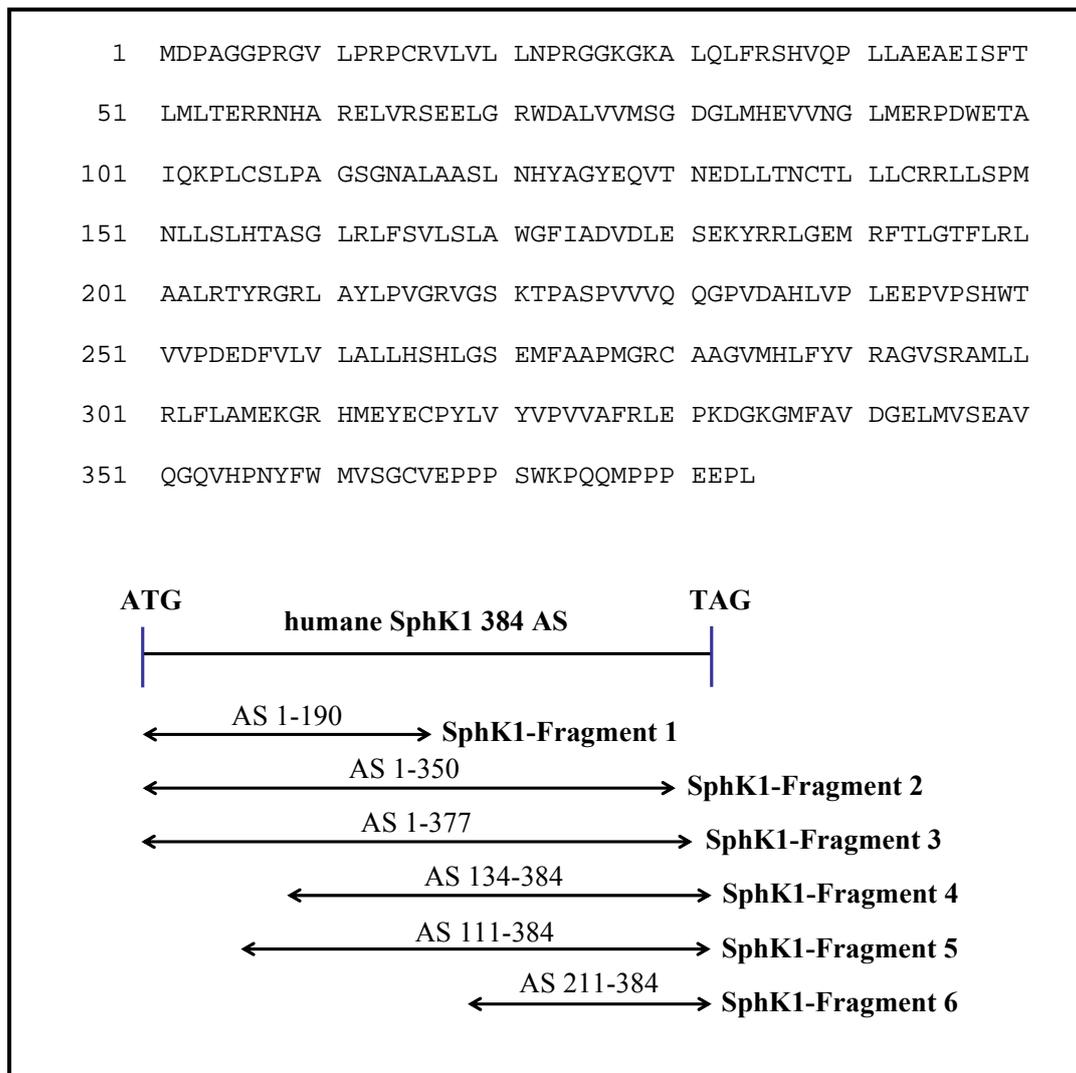


Abb. 9: Aminosäuresequenz der humanen SphK1 und Darstellung der SphK1-Fragmente

Die GFP-gekoppelte humane SphK1 diente als Vorlage zur Synthese der SphK1-Fragmente. Sechs SphK1-Fragmente wurden mit Hilfe von jeweils spezifischen Oligonukleotiden mittels PCR generiert und in den pECFP-C1-Vektor kloniert.

```

1  ATGGATCCAG CGGGCGGCC CCGGGGCGTG CTCCCGCGGC CCTGCCGCGT GCTGGTGCTG
   FhSK1-CFP-FL →
61  CTGAACCCGC GCGGCGGCAA GGGCAAGGCC TTGCAGCTCT TCCGGAGTCA CGTGCAGCCC
121 CTTTTGGCTG AGGCTGAAAT CTCCTTCACG CTGATGCTCA CTGAGCGGCG GAACCACGCG
181 CGGGAGCTGG TGCGGTCGGA GGAGCTGGGC CGCTGGGACG CTCTGGTGGT CATGTCTGGA
241 GACGGGCTGA TGCACGAGGT GGTGAACGGG CTCATGGAGC GGCCTGACTG GGAGACCGCC
301 ATCCAGAAGC CCCTGTGTAG CCTCCCAGCA GGCTCTGGCA ACGCGCTGGC AGCTTCCTTG
   FhSK1-CFP-F5 →
361 AACCATTATG CTGGCTATGA GCAGGTCACC AATGAAGACC TCCTGACCAA CTGCACGCTA
   FhSK1-CFP-F4 →
421 TTGCTGTGCC GCCGGCTGCT GTCACCCATG AACCTGCTGT CTCTGCACAC GGCTTCGGGG
481 CTGCGCCTCT TCTCTGTGCT CAGCCTGGCC TGGGGCTTCA TTGCTGATGT GGACCTAGAG
541 AGTGAGAAGT ATCGGCGTCT GGGGGAGATG CGCTTCACTC TGGGCACTTT CCTGCGTCTG
   ← RhSK1-CFP-F1
601 GCAGCCTTGC GCACTTACCG CGGCCGACTG GCTTACCTCC CTGTAGGAAG AGTGGGTTCC
   FhSK1-CFP-F6 →
661 AAGACACCTG CCTCCCCCGT TGTGGTCCAG CAGGGCCCCG TAGATGCACA CCTTGTGCCA
721 CTGGAGGAGC CAGTGCCCTC TCACTGGACA GTGGTGCCCG ACGAGGACTT TGTGCTAGTC
781 CTGGCACTGC TGCACCTGCA CCTGGGCAGT GAGATGTTTG CTGCACCCAT GGGCCGCTGT
841 GCAGCTGGCG TCATGCATCT GTTCTACGTG CGGGCGGGAG TGTCTCGTGC CATGCTGCTG
901 CGCCTCTTCC TGGCCATGGA GAAGGGCAGG CATATGGAGT ATGAATGCCC CTATTGGTA
961 TATGTGCCCG TGGTCGCCTT CCGCTTGGAG CCAAGGATG GGAAAGGTAT GTTTGCAGTG
1021 GATGGGGAAT TGATGGTTAG CGAGGCCGTG CAGGGCCAGG TGCACCCAAA CTATTCTGG
   ← RhSK1-CFP-F2
1081 ATGGTCAGCG GTTGCCTGGA GCCCCGCCC AGCTGGAAGC CCCAGCAGAT GCCACCGCCA
   ← RhSK1-CFP-F3
1141 GAAGAGCCCT TATGA
   ← RhSK1-CFP-FL

```

Abb. 10: Codierende Nukleotidsequenz der humanen SphK1

Die Sequenzen der bei der Amplifizierung der SphK1-Fragmente verwendeten Oligonukleotide sind unterstrichen dargestellt. Die Pfeile geben dabei die Leserichtung an.

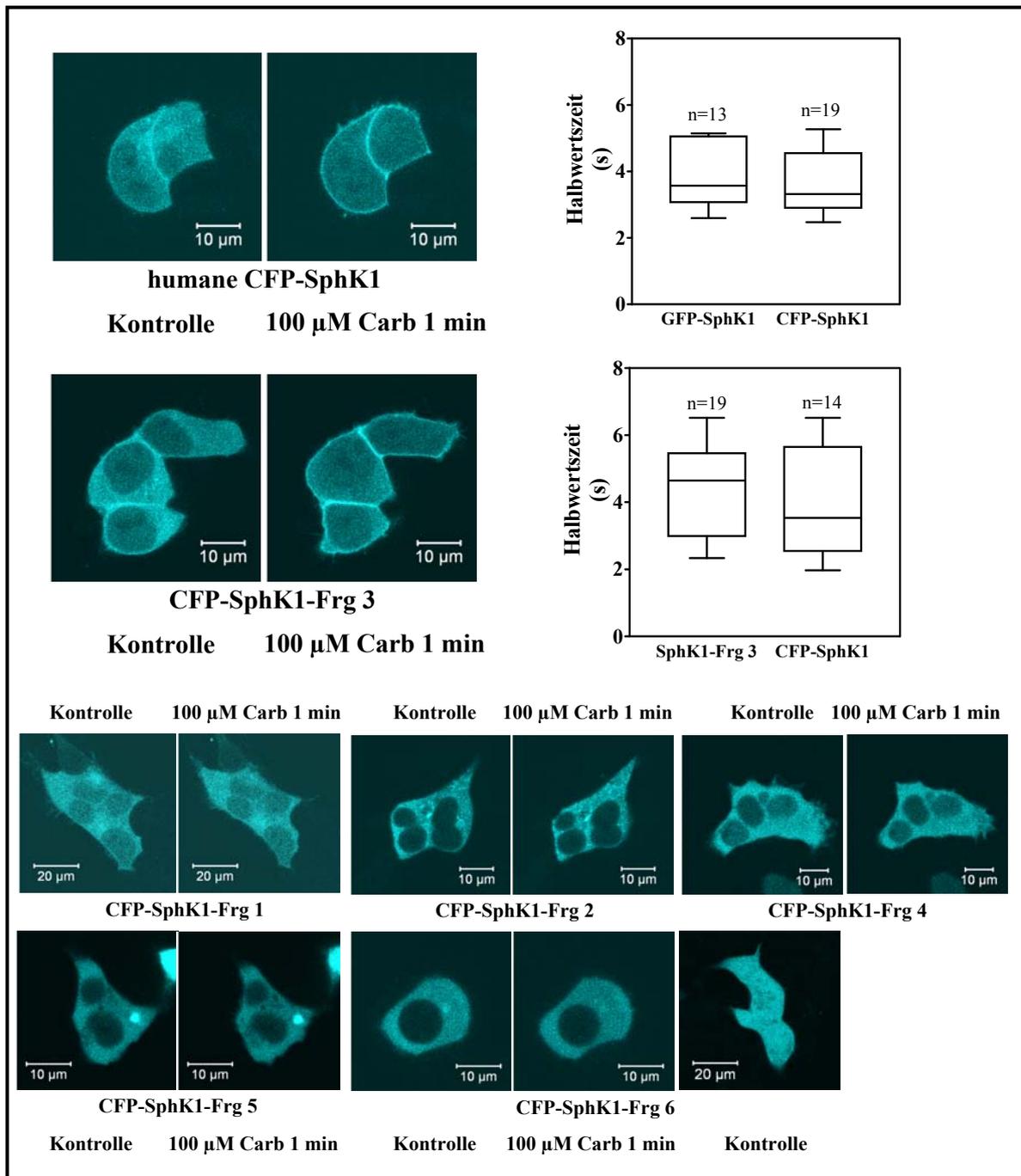


Abb. 11: Durch Carbachol induzierte Translokation der humanen CFP-SphK1 und der CFP-SphK1-Fragmente in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit der humanen CFP-SphK1 oder den CFP-gekoppelten Fragmenten 1-6 transfiziert. Die gezeigten Bildpaare zeigen Zellen vor und nach Stimulation mit 100 μ M Carbachol (Carb). Die Halbwertszeiten wurden durch Anpassung von Exponentialfunktionen an den Zeitverlauf der cytosolischen Fluoreszenzintensität ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus der Anzahl n der analysierten Zellen

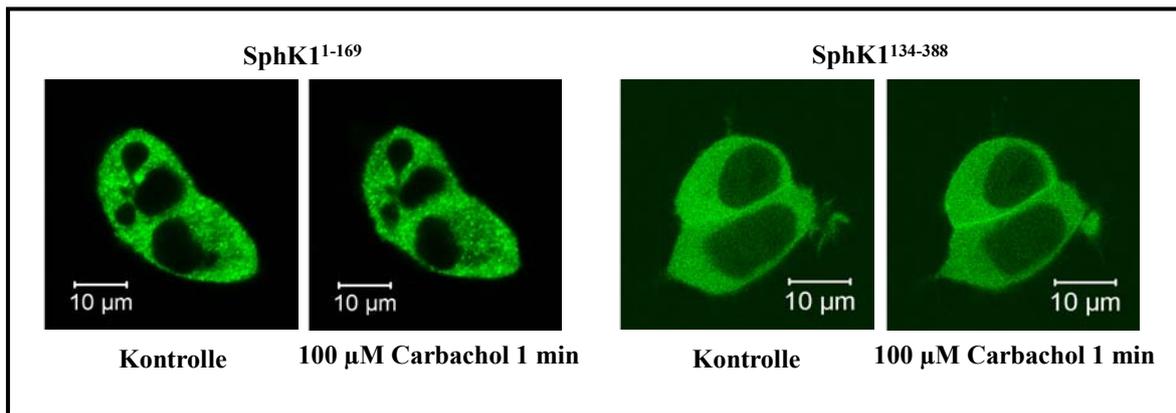


Abb. 12: Durch Carbachol induzierte Translokation der N- und C-terminalen Fragmente der murinen SphK1 in stabil den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit dem GFP-gekoppelten N-terminalen Fragment SphK1¹⁻¹⁶⁹ und dem C-terminalen Fragment SphK1¹³⁴⁻³⁸⁸ transfiziert. Die Bildpaare zeigen Zellen vor und nach Stimulation mit 100 μ M Carbachol.

4.1.4. Einfluss von konstitutiv aktivem $G\alpha_q$ auf die SphK1-Lokalisation

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{R183C}$ die Carbachol-stimulierte Translokation der murinen SphK1 an die Plasmamembran imitierte (Danneberg, 2003). Um zu überprüfen, ob dieser Einfluss von konstitutiv aktivem $G\alpha_q$, auch von anderen Mitgliedern der $G\alpha_q$ -Familie ausgeübt werden könnte, wurde der Einfluss von konstitutiv aktivem $G\alpha_{11}^{Q209L}$ getestet.

Da für die unter 3.2.4.4. beschriebenen Coimmunopräzipitationen das konstitutiv aktive $G\alpha_q^{Q209L}$ mit internem Glu-Glu-Epitop verwendet werden sollte, wurde untersucht, ob eine Expression dieses Proteins ebenfalls eine SphK1-Translokation auslösen würde. HEK-293-Zellen wurden mit konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE oder $G\alpha_{11}^{Q209L}$ und der YFP-gekoppelten murinen SphK1 cotransfiziert und die subzelluläre Lokalisation der YFP-SphK1 untersucht. Auch die Überexpression des konstitutiv aktiven $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE und des $G\alpha_{11}^{Q209L}$ induzierten eine massive Translokation der murinen SphK1 vom Cytosol an die Plasmamembran (Abb. 13 A). Dabei war die SphK1 zwar überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert, doch befand sich auch ein großer Teil der SphK1 in den Zellausläufern, mit denen sich die Zelle auf dem Untergrund anhaftete (Abb. 13 B).

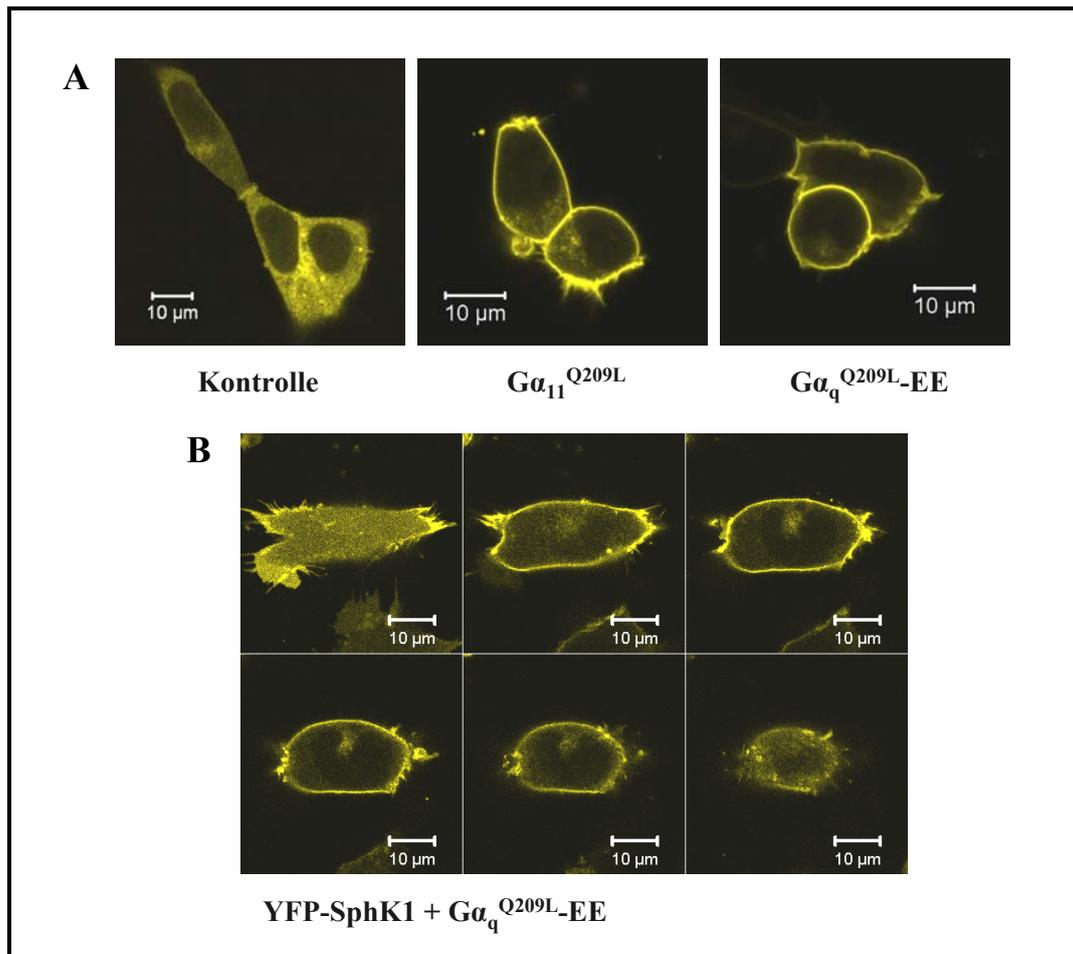


Abb. 13: Translokation der murinen SphK1 durch Überexpression von konstitutiv aktiven α -Untereinheiten verschiedener Mitglieder der $G\alpha_q$ -Familie in stabil den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit der murinen YFP-SphK1 und dem konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L-EE}$, $G\alpha_{11}^{Q209L}$ oder dem pcDNA3.1-Vektor cotransfiziert. B stellt einen Stapel von Bildschnitten durch eine Zelle dar. Insgesamt wurden sechs Schnittebenen durch die Zelle gelegt, wobei die Bildserien von links oben nach rechts unten die Schnittebenen von unten nach oben darstellen. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen.

4.1.5. Coimmunopräzipitation

Um zu untersuchen, ob eine direkte Interaktion von $G\alpha_q$ -Proteinen mit der SphK1 vorliegt, wurden mit muriner YFP-SphK1 und konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L-EE}$ oder mit pEYFP-Vektor und konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L-EE}$ cotransfizierte HEK-293-Zellen

Coimmunopräzipitationsstudien durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde für den pEYFP-Vektor und die YFP-SphK1 vor Versuchsbeginn überprüft und betrug ca. 70 %. In allen Präzipitaten wurden bei ca. 50 kDa die präzipitierten, schweren Ketten der verwendeten Antikörper immunodetektiert (Abb. 14 A und B). Die Immunodetektion der präzipitierten Proteine mit dem anti-YFP Living Colors Antikörper zeigte, dass sowohl die Fällung des freien YFP, sowie die Fällung der YFP-gekoppelten murinen SphK1 mit dem anti-YFP Living Colors Antikörper funktionierte (Abb. 14 A). Deutlich konnte kurz oberhalb der 29 kDa-Bande des Markers das Signal des 27 kDa großen YFP nachgewiesen werden (Abb. 14 A). Bei ca. 69 kDa ist deutlich das Signal der YFP-SphK1 zu sehen (Abb. 14 A). Durch die anti- $G\alpha_q$ -Immunodetektion, der mit dem anti-YFP Living Colors gefällten Proteine, konnte eine direkte Interaktion des konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE und der YFP-SphK1 nachgewiesen werden. Bei ca. 42 kDa war deutlich das Signal des mit der YFP-SphK1 copräzipitierten $G\alpha_q$ zu erkennen (Abb. 14 B). Im Gegensatz dazu konnte das $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE selbst nicht durch die Immunodetektion mit dem Antikörper anti- $G\alpha_q$ in den mit dem Antikörper anti-Glu-Glu gefällten Präzipitaten (Abb. 14 B) nachgewiesen werden.

Dies deutete darauf hin, dass die Fällung des konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE mit dem Antikörper anti-Glu-Glu nicht funktionierte. Auch der Versuch, das $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE mit dem Antikörper anti- $G\alpha_q$ zu präzipitieren verlief negativ (nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob die Präzipitationen mit dem Antikörper anti-Glu-Glu wirklich nicht funktionierten oder es vielleicht an der Immunodetektion mit dem anti- $G\alpha_q$ Antikörper lag, wurden HEK-293-Zellen mit $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE oder mit pcDNA3.1-Leervektor transfiziert und wie unter 3.2.4.4. beschrieben, immunpräzipitiert. Zusätzlich wurde neben den Präzipitaten, auch Aliquots der Lysate der mit $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE oder mit pcDNA3.1-Vektor transfizierten Zellen, auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und immunodetektiert. Wie in Abb. 15 gezeigt, konnte das konstitutiv aktive $G\alpha_q^{Q209L}$ nicht durch die Detektion mit dem Antikörper anti- $G\alpha_q$ in den Präzipitaten des Antikörpers anti-Glu-Glu nachgewiesen werden. Es war kein Unterschied zwischen den Präzipitaten der $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE transfizierten und den Präzipitaten der pcDNA3.1 transfizierten Zellen zu erkennen (Abb. 15). Jedoch konnte das überexprimierte $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE in den Lysaten der mit $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE transfizierten Zellen bei ca. 42 kDa nachgewiesen werden (Abb. 15). In den Lysaten der Kontrollzellen wurde deutlich das endogene $G\alpha_q$ bei ca. 42 kDa durch den Antikörper anti- $G\alpha_q$ detektiert (Abb. 15), jedoch war das Signal nicht so prägnant wie in den Lysaten der $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE transfizierten Zellen.

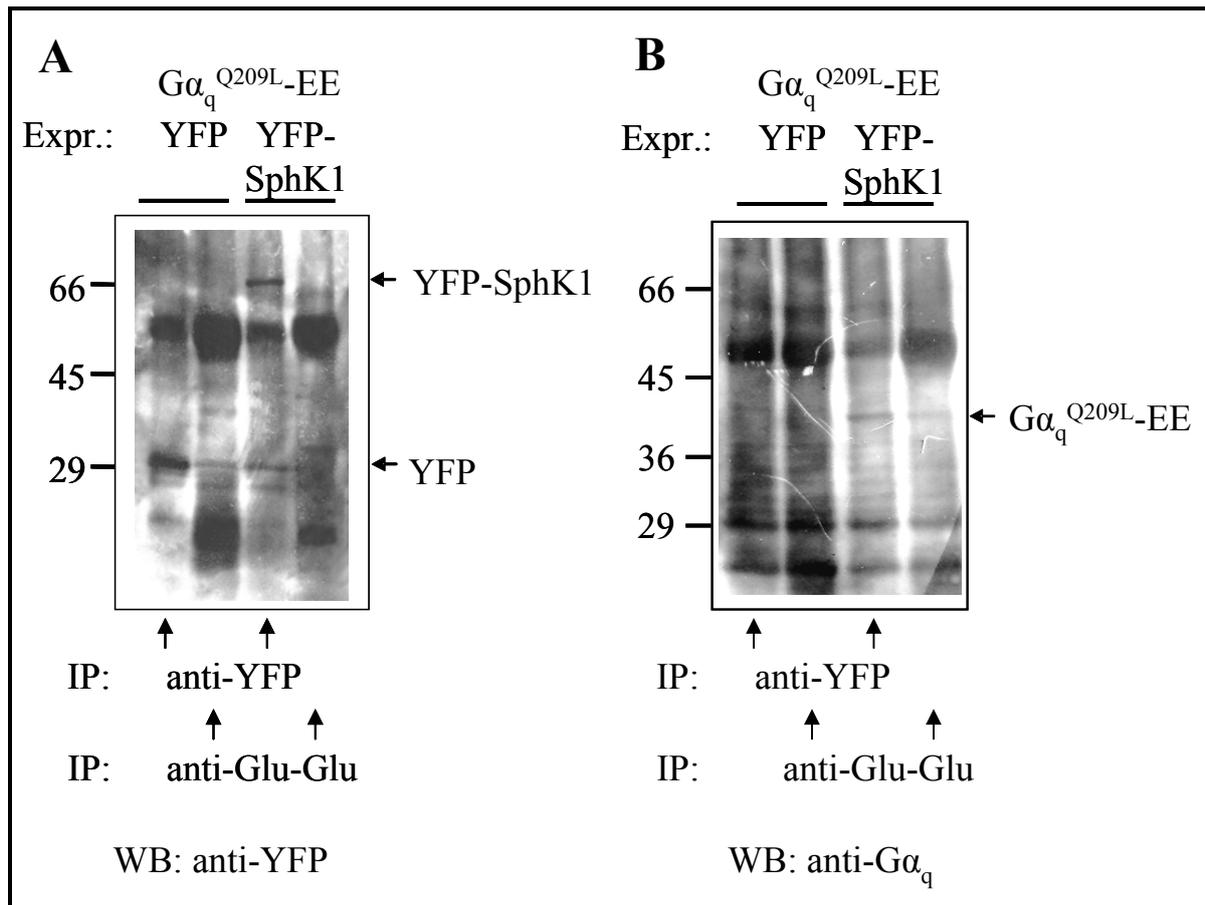


Abb. 14: Coimmunopräzipitation der murinen YFP-SphK1 und dem konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L-EE}$

Es wurden Lysate aus HEK-293-Zellen hergestellt, die mit dem pEYFP-Vektor und konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L-EE}$ oder der YFP-SphK1 und dem konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L-EE}$ cotransfiziert waren. Die Proteine wurden mit den Antikörpern gegen YFP und gegen das Epitop Glu-Glu präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit den Antikörper gegen YFP (A) oder gegen $G\alpha_q$ (B) und dem Sekundär-Antikörper gegen Kaninchen/Peroxidase Konjugat.

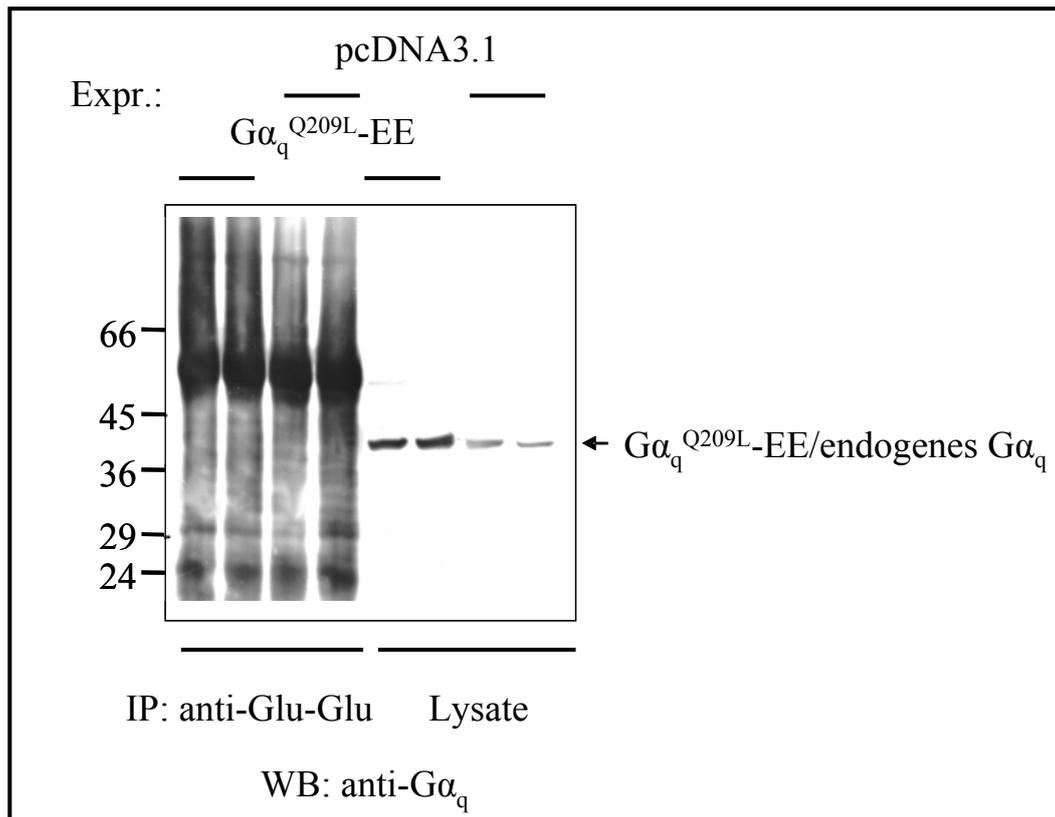


Abb. 15: Immunopräzipitation und Nachweis des Gα_q^{Q209L}-EE in Präzipitaten

Es wurden Lysate aus HEK-293-Zellen hergestellt, die mit Gα_q^{Q209L}-EE oder pcDNA3.1-Vektor transfiziert waren. Die Proteine wurden mit den Antikörpern gegen das Epitop Glu-Glu sowie mit Protein-A Sepharose Beads präzipitiert. Die präzipitierten Proteine bzw. Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit den Antikörper gegen Gα_q und dem Sekundär-Antikörper gegen Kaninchen/Peroxidase Konjugat.

4.2. Funktionelle Bedeutung der G_q-stimulierten Translokation der SphK1 an die Plasmamembran in den M₃-Rezeptor stabil exprimierenden HEK-293-Zellen

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen ergab sich als Nächstes die Frage, welche funktionelle Bedeutung die durch Carbachol induzierte Translokation der SphK1 an die Plasmamembran haben könnte. Es erschien wahrscheinlich, dass nach der G_q-stimulierten Translokation der SphK1 an die Plasmamembran dort vermehrt S1P gebildet werden könnte. Dieses lokal an der Plasmamembran gebildete S1P könnte dann die dort gelegenen G-Proteingekoppelten S1P-Rezeptoren aktivieren. Diese Hypothese wurde im Folgenden untersucht.

4.2.1. Lokalisation des S1P₁-Rezeptors vor und nach Stimulierung des M₃-Rezeptors

Eine Aktivierung von S1P-Rezeptoren lässt sich unter anderem anhand ihrer nachfolgenden Internalisierung nachweisen. Um zu untersuchen, ob die durch Carbachol induzierte SphK1-Translokation zu einer Aktivierung von S1P-Rezeptoren führen könnte, wurden stabil mit dem M₃-Rezeptor transfizierte HEK-293-Zellen mit einem GFP-gekoppelten S1P₁-Rezeptor transfiziert und die Zellen für 2 h mit S1P und Carbachol stimuliert. Danach wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation des Rezeptors überprüft. Nach der Überexpression des GFP-gekoppelten S1P₁-Rezeptors in HEK-293-Zellen war der Rezeptor in den Kontrollzellen vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 16). In den mit S1P stimulierten Zellen, die als Positivkontrollen der Rezeptorinternalisierung dienten, wurde der S1P₁-Rezeptor durch das exogene S1P größtenteils internalisiert und von der Plasmamembran in den perinukleären Raum des Cytosols transportiert.

Die Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol führte ebenfalls zur Internalisierung des S1P₁-Rezeptors (Abb. 16). Dabei war die Rezeptorinternalisierung jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei den mit S1P-stimulierten Zellen. Es war ein immer noch beträchtlicher Anteil der S1P₁-Rezeptoren in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert. Um diese Rezeptorinternalisierungen quantifizieren zu können, wurde für jede Zelle der Quotient aus der intrazellulären Fluoreszenzintensität und der totalen zellulären Fluoreszenzintensität errechnet. Wie in Abb. 16 gezeigt, induzierten sowohl S1P als auch Carbachol einen signifikanten Anstieg der relativen intrazellulären Fluoreszenz.

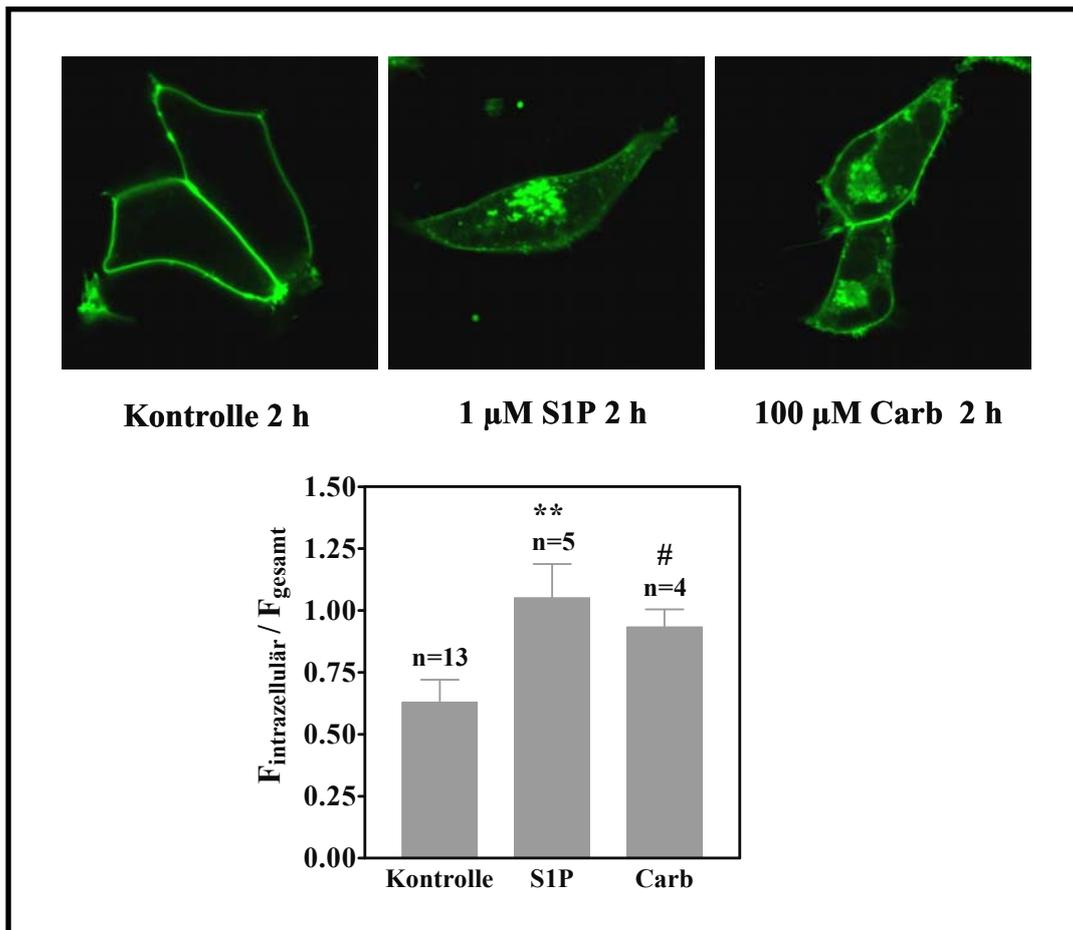


Abb. 16: Einfluss der Stimulation des M_3 -Rezeptors mit Carbachol auf den $S1P_1$ -Rezeptor in stabil den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit $S1P_1$ -GFP transfiziert. Die Zellen wurden für 2 h mit den jeweiligen Stimulantien inkubiert, bevor sie dann mit PFA fixiert wurden. Die Bildserie zeigt Zellen, die mit Vehikel, 1 µM S1P und 100 µM Carbachol (Carb) stimuliert wurden. Eine Quantifizierung der Daten wurde durchgeführt, indem der Quotient aus der intrazellulären Fluoreszenzintensität und der totalen zellulären Fluoreszenzintensität berechnet wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment (n = 3-7).

** $, P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # $, P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle in *One-Way ANOVA* gefolgt vom *Dunnet's Multiple Comparison Test*

4.2.2. Lokalisation der S1P₂- und S1P₃-Rezeptoren vor und nach Stimulierung des M₃-Rezeptors

Als Nächstes wurde untersucht, ob weitere S1P-Rezeptoren durch die Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol internalisiert werden könnten. Die mit 3xHA-S1P₂ bzw. 3xHA-S1P₃ transfizierten HEK-293-Zellen wurden mit Carbachol und S1P vorbehandelt, immungefärbt und die Lokalisation der Rezeptoren untersucht. Wie in Abb. 17 gezeigt ist, waren die beiden überexprimierten Rezeptoren S1P₂ und S1P₃ in den Kontrollzellen vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert. Die Stimulation mit S1P und auch mit Carbachol induzierten eine Internalisierung des S1P₂- sowie des S1P₃-Rezeptors (Abb. 17).

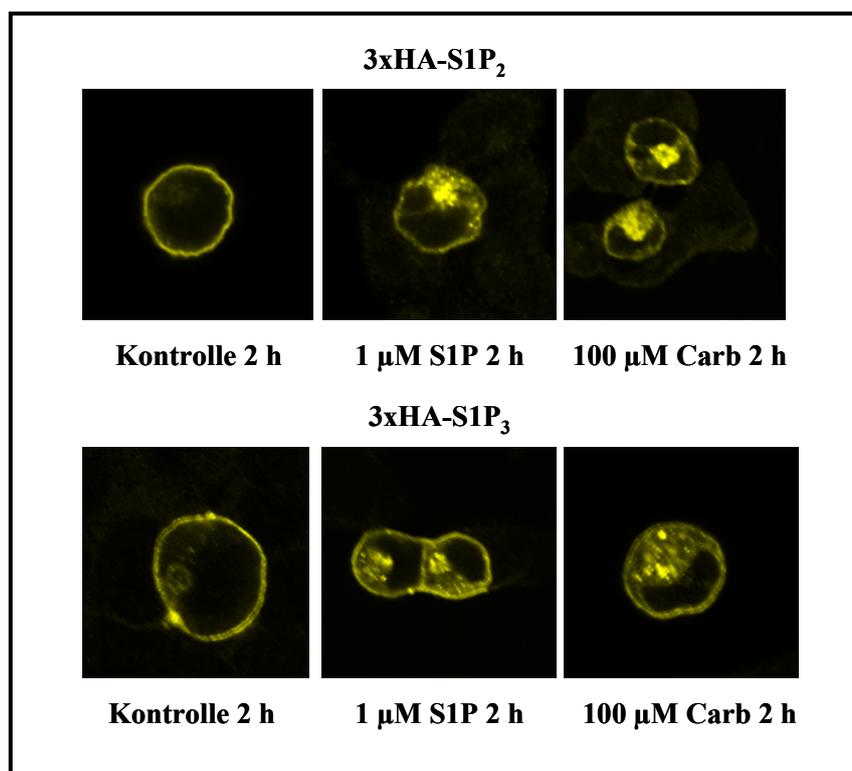


Abb. 17: Durch Carbachol induzierte Internalisierung der S1P-Rezeptoren S1P₂ und S1P₃ in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit 3xHA-S1P₂ und 3xHA-S1P₃ transfiziert, über Nacht in Medium ohne FKS inkubiert und für 2 h mit den Stimulantien inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und immungefärbt. Die Bildserie zeigt mit Vehikel, S1P und Carbachol (Carb) vorbehandelte Zellen.

4.2.3. Rolle der katalytischen Aktivität der SphK1 bei der durch Carbachol induzierten S1P₁-Rezeptorinternalisierung

Nachdem festgestellt worden war, dass die S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂ und S1P₃ durch die Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol internalisiert wurden, sollte weiter untersucht werden, ob die katalytische Aktivität der SphK1 für die durch Carbachol induzierte Internalisierung des S1P₁-Rezeptors notwendig war. Dafür wurden HEK-293-Zellen mit einer zuvor beschriebenen und freundlicherweise zur Verfügung gestellten katalytisch inaktiven und dominant-negativen SphK1^{G82D} und dem GFP-gekoppelten S1P₁-Rezeptor cotransfiziert und mit Carbachol und S1P stimuliert. Für diese SphK1^{G82D} war gezeigt worden, dass ihre Überexpression die durch verschiedene Agonisten induzierte Aktivierung der SphK1 blockiert, während die Überexpression keinen Einfluss auf die basale SphK-Aktivität besitzt (Pitson *et al.*, 2000b).

In den Kontrollzellen war die SphK1^{G82D} cytosolisch lokalisiert und der S1P₁-GFP-Rezeptor befand sich vorwiegend in der Plasmamembran der Zellen (Abb. 18). Die Stimulation mit S1P hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation der SphK1^{G82D}, die sich, wie in den Kontrollen, vorwiegend im Cytosol der Zellen befand (Abb. 18). Der S1P₁-Rezeptor wurde jedoch durch die Stimulation mit S1P deutlich in den perinukleären Raum der Zelle internalisiert (Abb. 18). Die Stimulation mit Carbachol induzierte die Translokation der SphK1^{G82D} vom Cytosol zur Plasmamembran (Abb. 18). Jedoch war keine durch Carbachol induzierte Internalisierung des S1P₁-Rezeptors in diesen Zellen zu beobachten. Der Rezeptor war, trotz der Translokation der SphK1^{G82D}, vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 18). Das spricht dafür, dass die Aktivität der SphK1 für die durch Carbachol induzierte Internalisierung des S1P₁-Rezeptors benötigt wird.

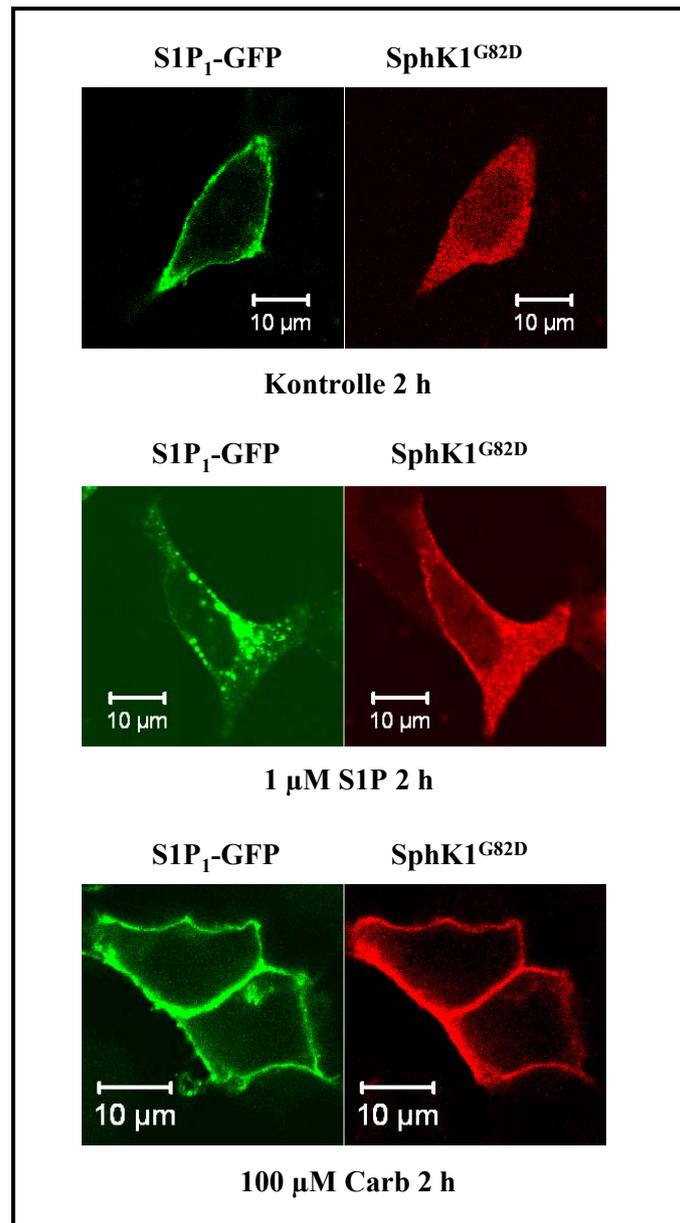


Abb. 18: Rolle der katalytischen Aktivität der SphK1 bei der durch Carbachol induzierten S1P₁-Rezeptorinternalisierung in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit der katalytisch inaktiven SphK1^{G82D} (rote Fluoreszenz) und S1P₁-GFP (grüne Fluoreszenz) cotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht in Serum-freiem Medium inkubiert, dann für 2 h mit Vehikel, S1P und Carbachol (Carb) vorbehandelt, anschließend fixiert und immungefärbt. Die Lokalisation der SphK1 und des S1P₁-Rezeptors wurde getrennt voneinander im Multikanal-Modus eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes aufgenommen.

4.2.4. Rolle der S1P₁-Rezeptoraktivierung bei der durch Carbachol induzierten S1P₁-Rezeptorinternalisierung

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte sich die Frage, ob die Aktivierung des S1P₁-Rezeptors durch S1P für die durch Carbachol induzierte Internalisierung dieses Rezeptors benötigt wird. Um dies zu untersuchen, wurden den M₃-Rezeptor stabil exprimierende HEK-293-Zellen mit den zwei S1P₁-Rezeptormutanten S1P₁^{R292A} und S1P₁^{K111A} transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden dann mit S1P und Carbachol vorbehandelt, fixiert und die Lokalisation der S1P₁-Rezeptormutanten im konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Die S1P₁^{R292A}-Mutante kann das S1P aufgrund der Mutation nicht binden und somit nicht aktiviert und internalisiert werden (Parrill *et al.*, 2000). Die S1P₁^{K111A}-Mutante diente als Kontrollmutante und sollte sicherstellen, dass eine Mutation nahe der S1P-Bindungstasche des Rezeptors keinen Einfluss auf die S1P-Bindung des Rezeptors hatte (Parrill *et al.*, 2000). Weder durch S1P noch durch Carbachol konnte eine Internalisierung der S1P₁^{R292A}-Mutante ausgelöst werden (Abb. 19). Wie bei den Kontrollen, befand sich die S1P₁^{R292A} nach Stimulation mit Carbachol bzw. S1P vorwiegend in der Plasmamembran. Bei den mit der Rezeptormutante S1P₁^{K111A} transfizierten Zellen induzierte hingegen das exogene S1P die Internalisierung dieser S1P₁-Mutante (Abb. 19). Auch die Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol löste eine Internalisierung des S1P₁^{K111A} aus (Abb. 19). Die Vorbehandlung der Kontrollzellen mit dem Vehikel beeinflusste die Lokalisation der S1P₁^{K111A}-Mutante jedoch nicht und der Rezeptor war vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 19). Dieses Ergebnis war ein Indiz dafür, dass die Aktivierung des S1P₁-Rezeptors für die durch Carbachol induzierte S1P₁-Rezeptorinternalisierung notwendig war.

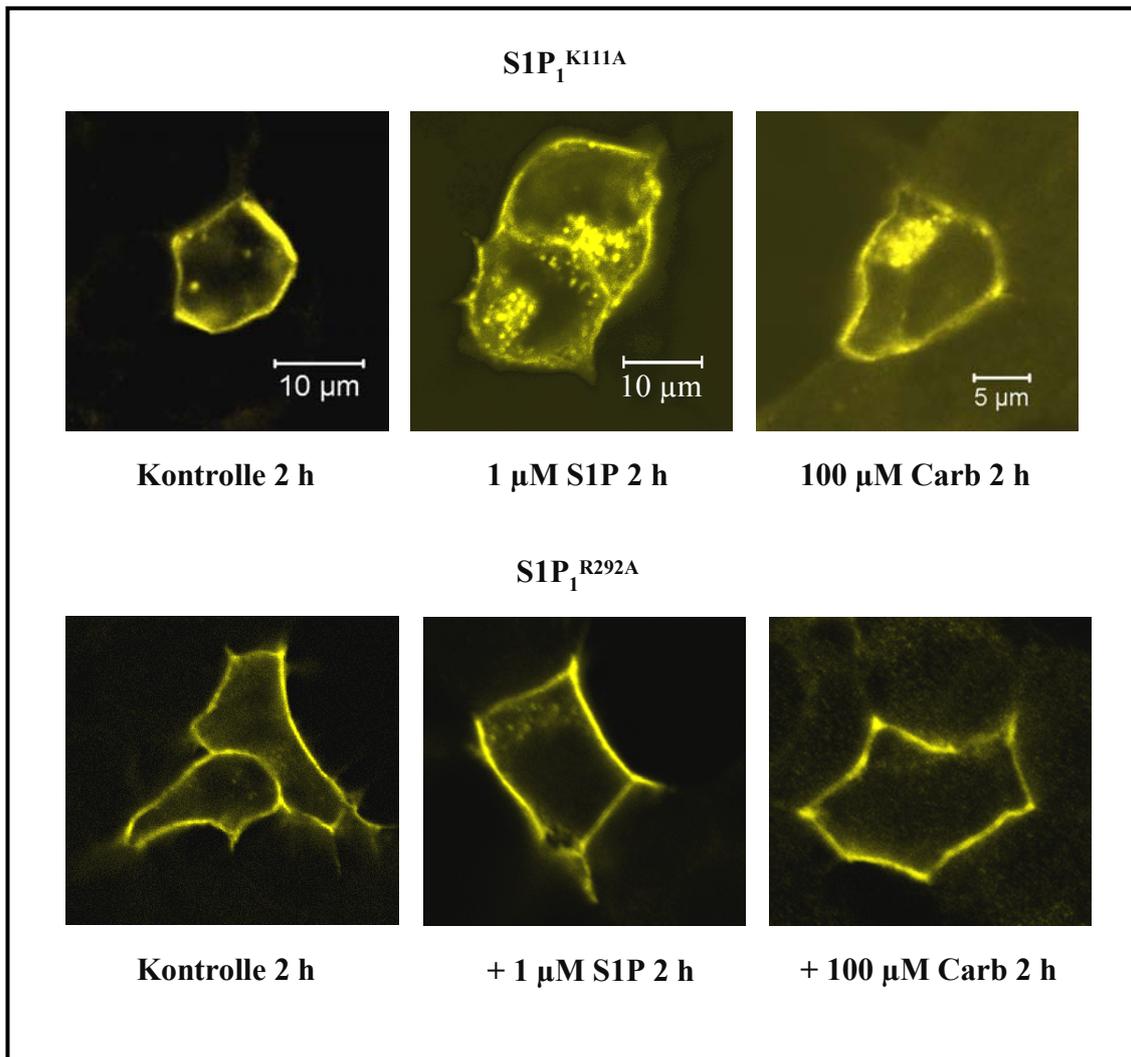


Abb. 19: Rolle der S1P₁-Rezeptoraktivierung bei der durch Carbachol induzierten S1P₁-Rezeptorinternalisierung in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit den S1P₁-Rezeptor-Mutanten S1P₁^{K111A} und S1P₁^{R292A} transfiziert. Vor dem Experiment wurden die Zellen über Nacht in Medium ohne FKS inkubiert und für 2 h mit Vehikel, S1P und Carbachol (Carb) vorbehandelt. Danach wurden die Zellen fixiert, immungefärbt und die Bildserie aufgenommen.

4.2.5. Einfluss von VPC23019 auf die durch Carbachol induzierte S1P₁-Rezeptorinternalisierung

In der Literatur wurde eine Verbindung namens VPC23019 als ein kompetitiver S1P₁/S1P₃-Rezeptor-Antagonist beschrieben (Davis *et al.*, 2005). Es sollte zunächst untersucht werden, ob VPC23019 einen Einfluss auf die S1P-induzierte S1P₁-Rezeptorinternalisierung hatte. Dazu wurden mit S1P₁-GFP transfizierte HEK-293-Zellen zuerst mit dem Vehikel bzw. VPC23019 für 1 h vorbehandelt und dann mit S1P stimuliert. In den mit dem Vehikel vorbehandelten Zellen befand sich der S1P₁-Rezeptor in den Kontrollzellen überwiegend in der Plasmamembran (Abb. 20). Ebenfalls hatte das Vehikel keinen Einfluss auf die durch S1P induzierte S1P₁-Rezeptorinternalisierung (Abb. 20). Die Vorbehandlung der Zellen mit dem S1P₁/S1P₃-Rezeptor-Antagonisten VPC23019 verursachte jedoch eine deutliche Hemmung der durch S1P induzierten S1P₁-Rezeptorinternalisierung (Abb. 20).

Der S1P₃-Rezeptor ist an der Induktion von intrazellulären Ca²⁺-Anstiegen in HEK-293-Zellen beteiligt. Deshalb wurden die durch S1P ausgelösten Ca²⁺-Anstiege mit und ohne VPC23019-Vorbehandlung anhand von S1P-Konzentrations-Wirkungskurven untersucht. VPC23019 selber induzierte bei diesen Ca²⁺-Messungen keine [Ca²⁺]_i-Anstiege (nicht gezeigt). Die Vorbehandlung der HEK-293-Zellen mit VPC23019 führte zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der S1P-Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 20). In den Kontrollzellen induzierte S1P [Ca²⁺]_i-Anstiege mit einer EC₅₀ von 3 nM während sie in den mit VPC23019 vorbehandelten Zellen 18 nM betrug. Jedoch hatte VPC23019 keinen Einfluss auf die [Ca²⁺]_i-Anstiege durch Stimulation der Rezeptoren des S1P-verwandten Lysophospholipids LPA (Abb. 20). Diese Ergebnisse passten zur Hypothese, dass es sich bei VPC23019 um einen kompetitiven S1P₁/S1P₃-Rezeptor-Antagonisten handelt.

Als Nächstes wurde untersucht, ob VPC23019 auch die durch Carbachol induzierte Internalisierung des S1P₁-Rezeptors inhibieren könnte. Dafür wurden mit S1P₁-GFP transfizierte HEK-293-Zellen für 1 h mit VPC23019 vorbehandelt und danach für 2 h mit Carbachol stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation des S1P₁-Rezeptors untersucht. In den mit dem Vehikel vorbehandelten Zellen befand sich der S1P₁-Rezeptor in den Kontrollzellen in der Plasmamembran (Abb. 21). Durch die Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol wurde der S1P₁-Rezeptor in den mit Vehikel vorbehandelten Zellen deutlich internalisiert (Abb. 21). Durch die VPC23019-Vorbehandlung konnte die durch Stimulation des M₃-Rezeptors induzierte S1P₁-Internalisierung jedoch deutlich inhibiert werden (Abb.21). Um diese Ergebnisse zu quantifizieren, wurde für jede Zelle der Quotient

aus der gemessenen intrazellulären Fluoreszenzintensität und der totalen zellulären Fluoreszenzintensität berechnet. Während bei den mit dem Vehikel stimulierten Zellen kein Unterschied zwischen den mit Lösungsmittel und VPC23019 vorbehandelten Zellen festzustellen war, konnte die Internalisierung des S1P₁-Rezeptors durch S1P mit VPC23019 signifikant inhibiert werden (Abb. 21). Bei den mit Carbachol stimulierten Zellen inhibierte VPC23019 die S1P₁-Rezeptorinternalisierung ebenfalls signifikant (Abb. 21).

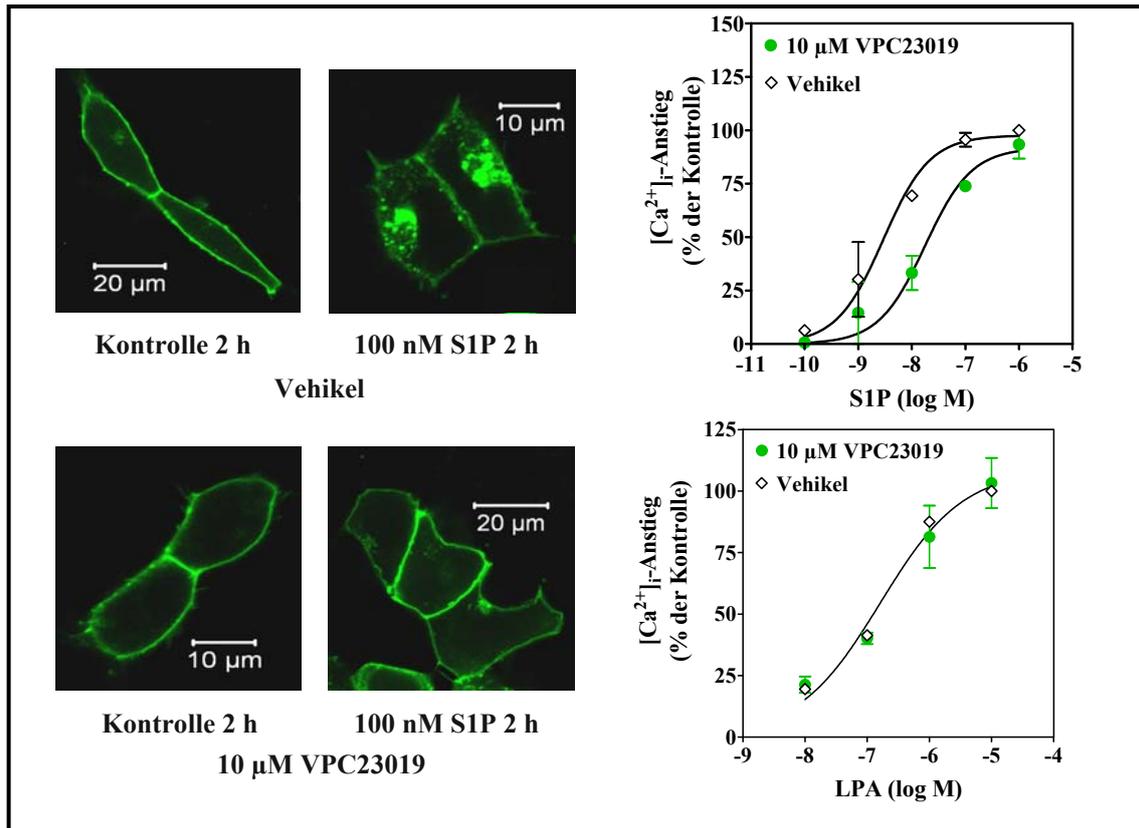


Abb. 20: Hemmung der durch S1P induzierten Ca²⁺-Anstiege und S1P₁-Rezeptorinternalisierungen durch VPC23019 in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit S1P₁-GFP transfiziert und mit Vehikel oder VPC23019 für 1 h vorbehandelt. Um den Einfluss auf den S1P₁-Rezeptor zu untersuchen, wurden die Zellen dann für 2 h mit Vehikel oder S1P inkubiert und anschließend fixiert. Die Bildserie wurde an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen. Um den Einfluss auf die durch S1P induzierten Ca²⁺-Anstiege zu untersuchen, wurden die Zellen nach der VPC23019-Vorbehandlung mit Fura-2 inkubiert und mit unterschiedlichen S1P-/LPA-Konzentrationen stimuliert. Die Kurven ergeben sich aus den Mittelwerten ± SD eines repräsentativen Experimentes, das in 2- bis 3-fach Werten durchgeführt wurde.

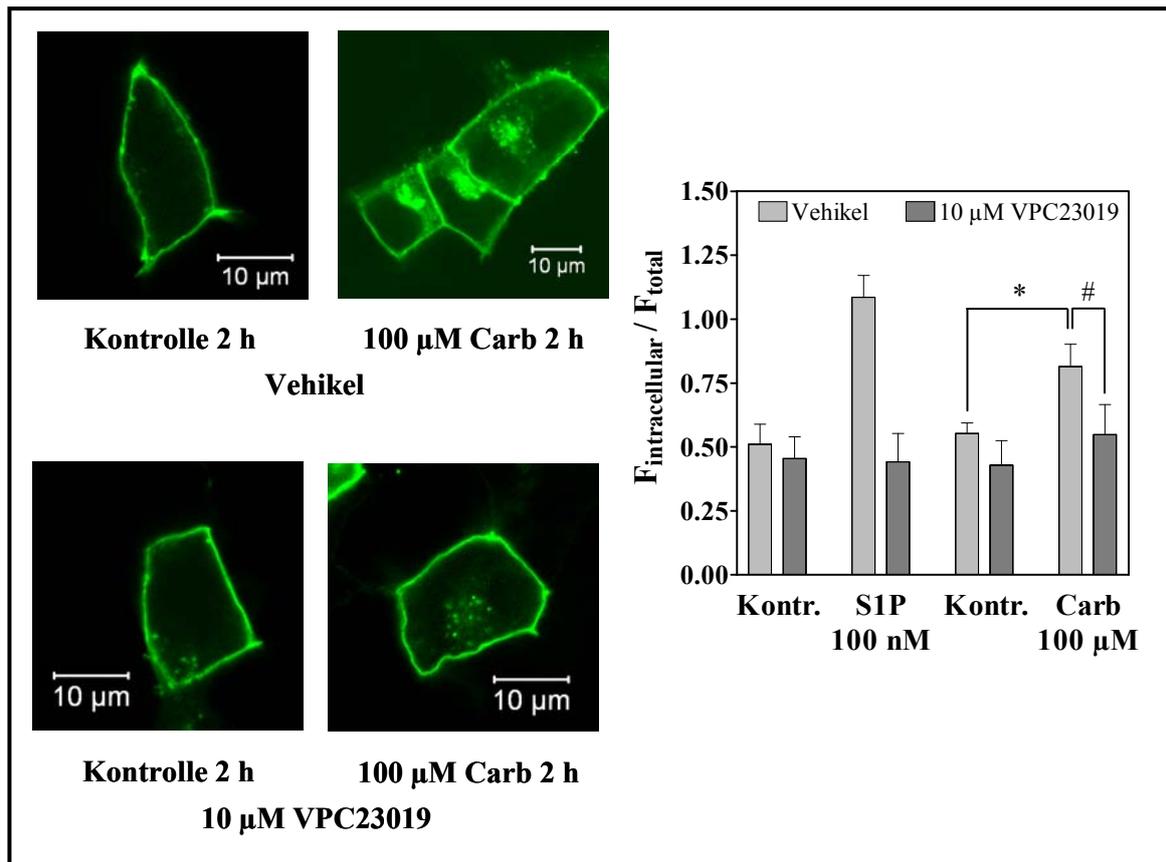


Abb. 21: Einfluss von VPC23019 auf die durch Carbachol induzierte S1P₁-Rezeptorinternalisierung in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit S1P₁-GFP transfiziert und mit Vehikel oder VPC23019 für 1 h vorbehandelt. Um den Einfluss des VPC23019 auf die durch Carbachol induzierte S1P₁-Rezeptorinternalisierung zu untersuchen, wurden die Zellen für 2 h mit Vehikel oder Carbachol (Carb) inkubiert und anschließend fixiert. Die Rezeptorinternalisierungen wurden quantifiziert, indem der Quotient aus der intrazellulären Fluoreszenz und der totalen zellulären Fluoreszenz berechnet wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment (n=6-13).*, $P < 0,001$ in *One-Way ANOVA* gefolgt von *Bonferroni's Multiple Comparison Test*; #, $P < 0,001$ in *Two-Way ANOVA* gefolgt von *Bonferroni posttests*

4.2.6. Wirkung von konstitutiv aktivem $G\alpha_q$ auf die Lokalisation des $S1P_1$ -Rezeptors

Wie bei Punkt 4.1.4. gezeigt wurde, induzierte die Überexpression von konstitutiv aktiven $G\alpha_q$ eine Translokation der SphK1 vom Cytosol zur Plasmamembran. Deshalb wurde untersucht, ob das konstitutiv aktive $G\alpha_q$ auch einen Einfluss auf die Lokalisation des $S1P_1$ -Rezeptors haben könnte. Dafür wurden HEK-293-Zellen mit $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE und $S1P_1$ -GFP cotransfiziert und die Lokalisation des $S1P_1$ -Rezeptors untersucht. Wie in Abb. 22 gezeigt ist, induzierte die Überexpression von konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE die Internalisierung des $S1P_1$ -Rezeptors in HEK-293-Zellen. Die Lokalisation der $S1P_1$ -Rezeptormutante $S1P_1^{R292A}$ blieb jedoch durch das überexprimierte, konstitutiv aktive $G\alpha_q$ unbeeinflusst. (Abb. 22).

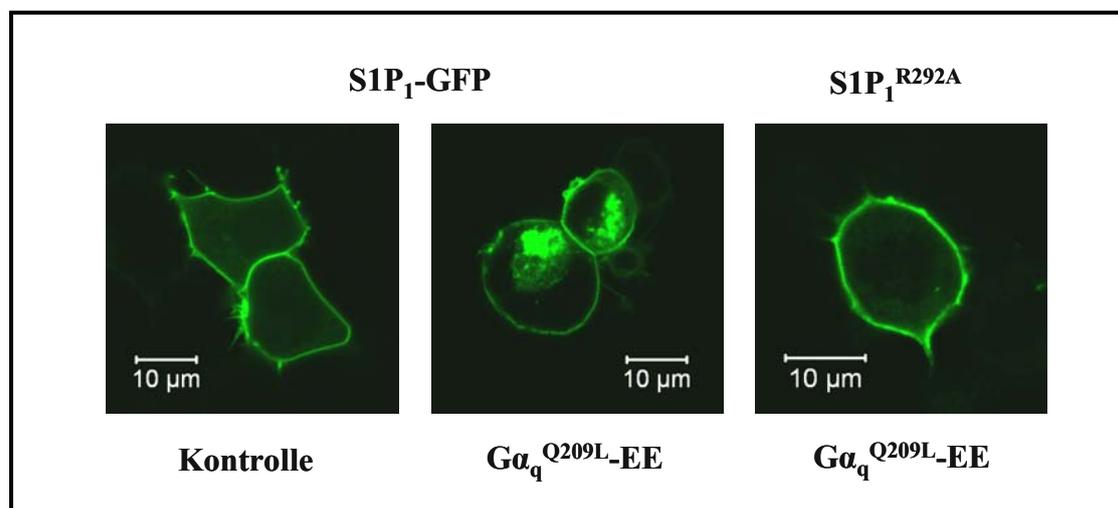


Abb. 22: Einfluss der Expression von konstitutiv aktivem $G\alpha_q$ auf die Lokalisation des $S1P_1$ -Rezeptors in stabil den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Stabil den M_3 -Rezeptor exprimierende HEK-293-Zellen wurden mit $S1P_1$ -GFP oder der $S1P_1^{R292A}$ -Mutante und $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE cotransfiziert. Die Bildserie wurde am 3. Tag nach der Transfektion mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen.

4.3. Ca^{2+} -Homöostase in *SGPLI*^{-/-}-MEFs

Die intrazelluläre Konzentration des Lysophospholipids S1P wird durch die SphK und durch die abbauenden Enzyme S1P-Lyase, S1P-Phosphatasen und verschiedene Lipidphosphat-Phosphohydrolasen streng reguliert (Pyne und Pyne, 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit standen MEFs zur Verfügung, die aus S1P-Lyase defizienten Mäusen gewonnen worden waren. In diesen Zellen war der intrazelluläre S1P-Spiegel deutlich erhöht (Van Veldhoven, 2005). Die S1P-Lyase ist im ER lokalisiert, wobei ihr katalytisch aktives Zentrum zum Cytosol der Zelle gerichtet ist (Van Veldhoven, 2000). Diese Lokalisation legt nahe, dass die S1P-Lyase eher an der Regulation intrazellulärer -, als an der Regulation extrazellulärer S1P-Konzentrationen beteiligt sein könnte. Intrazelluläres S1P wiederum ist in der Lage unabhängig von den G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern freizusetzen (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003). Deswegen sollte die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase und die durch Agonisten ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in *SGPLI*^{-/-}-MEFs sowie *SGPLI*^{+/+}-MEFs untersucht werden.

4.3.1. Basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und durch Agonisten induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege

Es wurden die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowie die durch verschiedene Agonisten induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in mit Fura-2 inkubierten Zellen untersucht. Wie Abb. 22 zeigt, betragen die basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Gegenwart von extrazellulären Ca^{2+} in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs 316 ± 20 nM. Im Vergleich dazu war die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs viel niedriger und betrug nur 118 ± 8 nM (Abb. 23). In der Regel beträgt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Cytosol von Zellen ca. 100 nM (Berridge *et al.*, 2000). Somit ergaben die Messungen, dass die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs signifikant erhöht und fast dreifach so hoch war, wie die gemessene basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs. Die *SGPLI*^{+/+}-MEFs dagegen zeigten basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die den Literaturwerten entsprachen. Um zu überprüfen, ob diese basal erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus einem verstärkten Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen resultierte, wurden die basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} gemessen. Auch in der Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} war die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der *SGPLI*^{-/-}-MEFs mit 252 ± 38 nM signifikant höher, als die in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs gemessenen 123 ± 16 nM (Abb. 23). Der Unterschied zwischen den beiden Zelltypen war jedoch nicht so stark ausgeprägt, wie bei den Messungen in Gegenwart von extrazellulären Ca^{2+} .

Als Nächstes wurde untersucht, ob die durch Agonisten induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs ebenfalls erhöht waren. Die *SGPLI*^{-/-}-MEFs und *SGPLI*^{+/+}-MEFs wurden dazu mit 1 μM S1P, 1 μM LPA und 1 μM Bradykinin stimuliert. Repräsentative

Zeitverläufe der $[Ca^{2+}]_i$ in $SGPLI^{+/+}$ - und $SGPLI^{-/-}$ -MEFs nach Stimulation mit S1P, LPA und Bradykinin sind in den Abb. 24 A bis C dargestellt. Die durch LPA induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in den $SGPLI^{-/-}$ -MEFs waren signifikant höher und entsprachen 156 ± 17 % der in den $SGPLI^{+/+}$ -MEFs gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege (Abb. 24 D). Auch die durch S1P induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege waren mit 198 ± 28 % der in den $SGPLI^{+/+}$ -MEFs gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege deutlich erhöht (Abb. 24 D). Die größten Unterschiede zwischen $SGPLI^{+/+}$ - und $SGPLI^{-/-}$ -MEFs wurden bei den durch Bradykinin induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen festgestellt. (Abb. 23 D). In den mit Bradykinin stimulierten $SGPLI^{-/-}$ -MEFs betrug die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege 400 ± 52 % der in den $SGPLI^{+/+}$ -MEFs gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege (Abb. 24 D). Dies zeigte, dass neben der basalen $[Ca^{2+}]_i$ auch die durch Agonisten induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in den $SGPLI^{-/-}$ -MEFs signifikant erhöht waren.

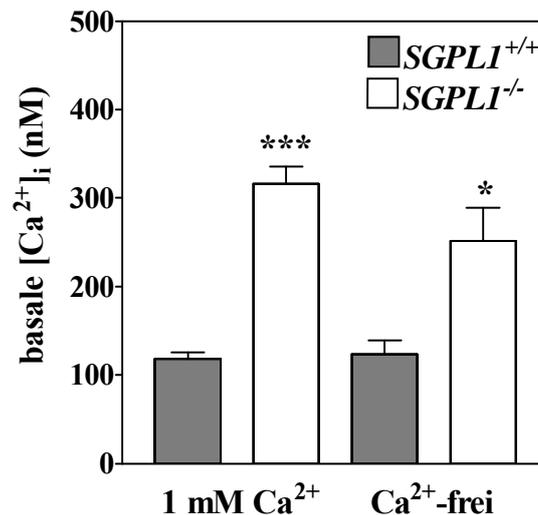


Abb. 23: Basale $[Ca^{2+}]_i$ in $SGPLI^{-/-}$ - und $SGPLI^{+/+}$ -MEFs

In mit Fura-2 inkubierten MEFs erfolgten die Messungen der basalen $[Ca^{2+}]_i$ sowohl in Gegenwart von 1 mM extrazellulärem Ca^{2+} (n=16) als auch in Ca^{2+} -freiem Medium (n=6). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus der Anzahl n der analysierten Zellen.

*, $P < 0,05$ im Vergleich zu den $SGPLI^{+/+}$ -MEFs im *One-sample t-test*; ***, $P < 0,001$ im Vergleich zu den $SGPLI^{+/+}$ -MEFs im *One-sample t-test*

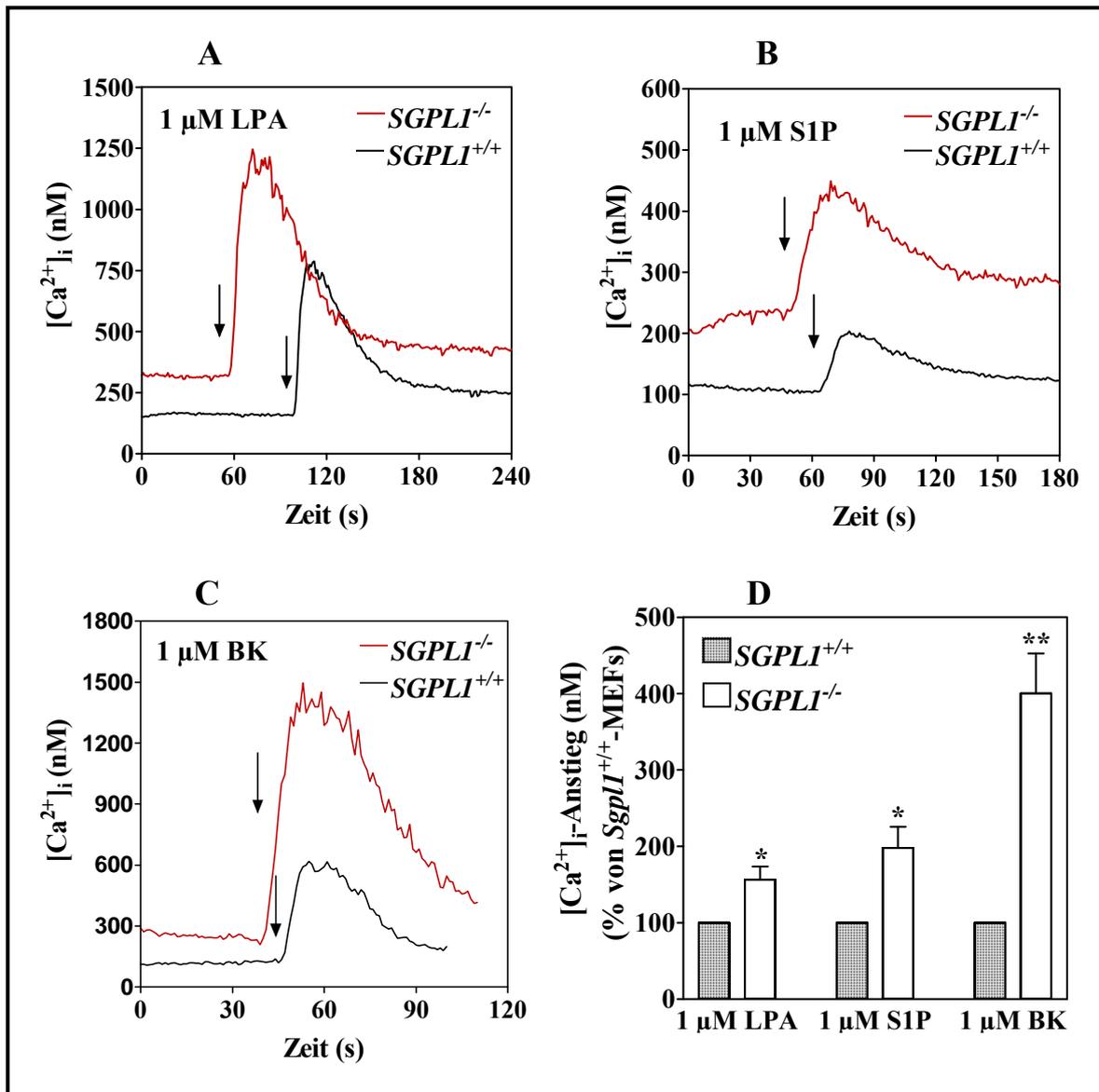


Abb. 24: Durch Agonisten ausgelöste $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in $SGPLI^{-/-}$ - und $SGPLI^{+/+}$ -MEFs

A-C: Gezeigt sind repräsentative Zeitverläufe der $[Ca^{2+}]_i$. Die Zellen wurden mit 1 μ M LPA, 1 μ M S1P oder 1 μ M Bradykinin (BK) stimuliert. Der Pfeil weist auf den jeweiligen Zeitpunkt der Stimulation hin. D: Differenz zwischen maximaler und basaler $[Ca^{2+}]_i$ in mit LPA (n=5), S1P (n=3) und Bradykinin (n=3) stimulierten Zellen. Die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege sind als % der in $SGPLI^{+/+}$ -MEFs gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus der Anzahl n der analysierten Zellen.

*, $P < 0,05$ im Vergleich zu den $SGPLI^{+/+}$ -MEFs im *One-sample t-test*; **, $P < 0,01$ im Vergleich zu den $SGPLI^{+/+}$ -MEFs im *One-sample t-test*

4.3.2. Durch Thapsigargin induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege

Die oben dargestellten Ergebnisse legten die Frage nahe, ob die erhöhten Agonist-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege auf einer vermehrten Speicherung von Ca^{2+} in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs basierten. Deshalb wurde der Einfluss der S1P-Lyase-Defizienz auf die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit Thapsigargin stimuliert, welches die Ca^{2+} -ATPase des ER (SERCA) hemmt. Thapsigargin bewirkt also einen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, der auf einem mangelnden Rücktransport der cytosolischen Ca^{2+} -Ionen in das ER beruht und daher den Füllungszustand der Ca^{2+} -Speicher widerspiegelt. Die Abb. 25 A zeigt die gemittelten Zeitverläufe der Thapsigargin-Stimulation in *SGPLI*^{-/-}- und *SGPLI*^{+/+}-MEFs. Die Thapsigargin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege waren in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs deutlich erhöht (Abb. 25 B). Dabei induzierte 1 μ M Thapsigargin $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege um 302 ± 25 nM in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs, während die durch Thapsigargin induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs nur 203 ± 18 nM betragen (Abb. 24 B).

Der $[Ca^{2+}]_i$ -Höchstwert war in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs mit 526 ± 44 nM signifikant höher als die 284 ± 21 nM in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs (Abb. 25 B). Die basale $[Ca^{2+}]_i$ war auch in dieser Serie von Experimenten in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs signifikant erhöht (Abb. 24 B). Die Geschwindigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieges betrug in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs $7,4 \pm 0,9$ nM/s während der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs mit $13,1 \pm 1,7$ nM/s signifikant schneller war (Abb. 25 C). Um zu überprüfen, ob vielleicht ein Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen für die gemessenen Unterschiede verantwortlich war, wurden die durch Thapsigargin induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} gemessen. Die Abb. 26 A zeigt die gemittelten Zeitverläufe der Thapsigargin-Stimulation in *SGPLI*^{-/-}- und *SGPLI*^{+/+}-MEFs in Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} . Es zeigte sich, dass die durch Thapsigargin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege auch im Ca^{2+} -freien Medium bei den *SGPLI*^{-/-}-MEFs signifikant erhöht waren (Abb. 26 B). Thapsigargin induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege um 134 ± 6 nM in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs und um 98 ± 8 nM in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs (Abb. 26 B).

Auch die $[Ca^{2+}]_i$ -Höchstwerte waren in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs mit 275 ± 16 nM signifikant höher als in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs, wo die $[Ca^{2+}]_i$ -Höchstwerte nur 175 ± 8 nM betragen (Abb. 26 B). Die basale $[Ca^{2+}]_i$ war ebenfalls in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs signifikant erhöht (Abb. 26 B). Die Geschwindigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieges betrug in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs $2,6 \pm 0,1$ nM/s während der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs mit $3,8 \pm 0,3$ nM/s signifikant schneller war (Abb. 26 C). Dabei waren die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und auch die Geschwindigkeit in den *SGPLI*^{+/+}-MEFs und *SGPLI*^{-/-}-MEFs im Ca^{2+} -freien Medium deutlich geringer bzw.

langsamer, als in den Messungen mit extrazellulärem Ca^{2+} . Diese Ergebnisse zeigten, dass die Ca^{2+} -Speicher der $\text{SGPLI}^{-/-}$ -MEFs mehr Ca^{2+} enthielten als die der $\text{SGPLI}^{+/+}$ -MEFs.

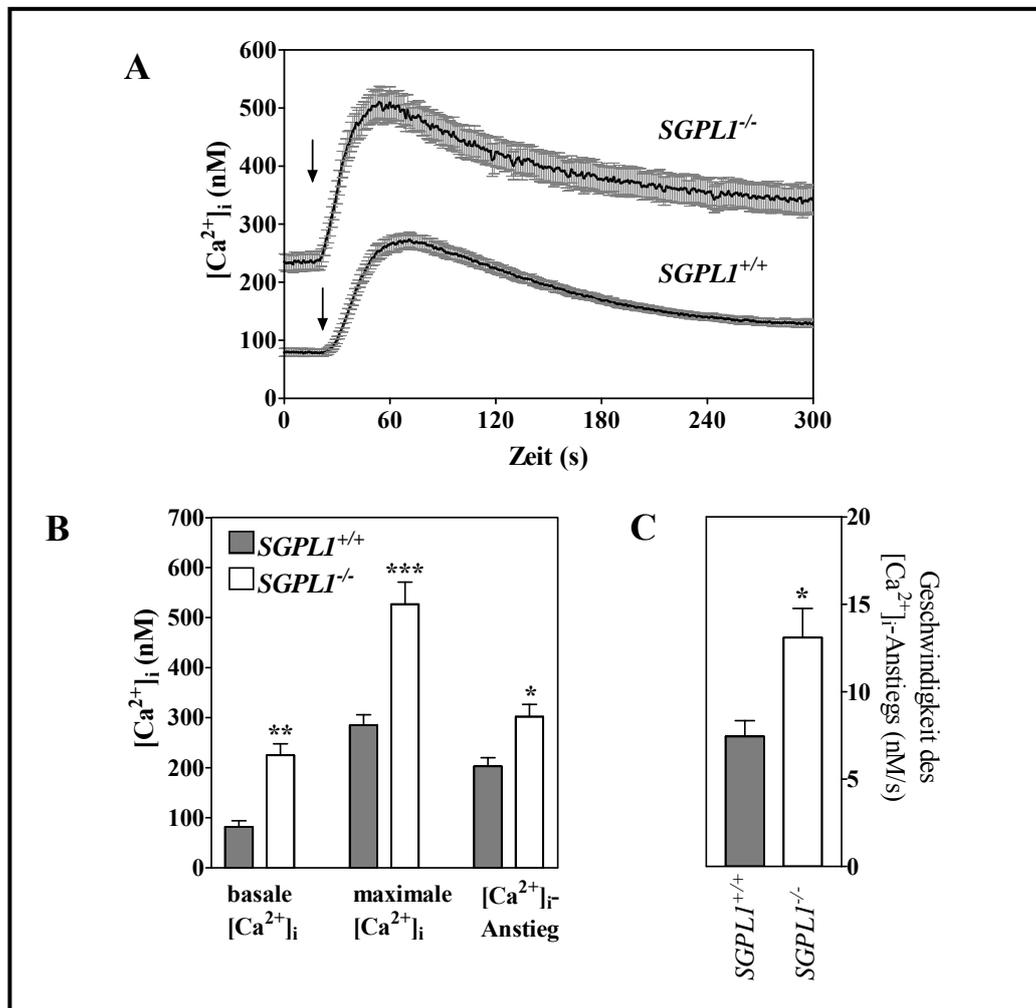


Abb. 25: Durch Thapsigargin induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in $\text{SGPLI}^{-/-}$ - und $\text{SGPLI}^{+/+}$ -MEFs

A: Gezeigt sind die aus 15 Messungen in $\text{SGPLI}^{-/-}$ -MEFs und 16 Messungen in $\text{SGPLI}^{+/+}$ -MEFs gemittelten (\pm SEM) Zeitverläufe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Der Pfeil weist auf den Zeitpunkt der Stimulation mit 1 μM Thapsigargin hin. B und C: Gezeigt sind basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$, maximal erreichte $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg (B) sowie Geschwindigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (C) nach Stimulation mit 1 μM Thapsigargin in $\text{SGPLI}^{-/-}$ - und $\text{SGPLI}^{+/+}$ -MEFs. In B und C sind die Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Messungen gezeigt, die jeweils in Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$, je in *Two-Way ANOVA* gefolgt von *Bonferroni posttests*

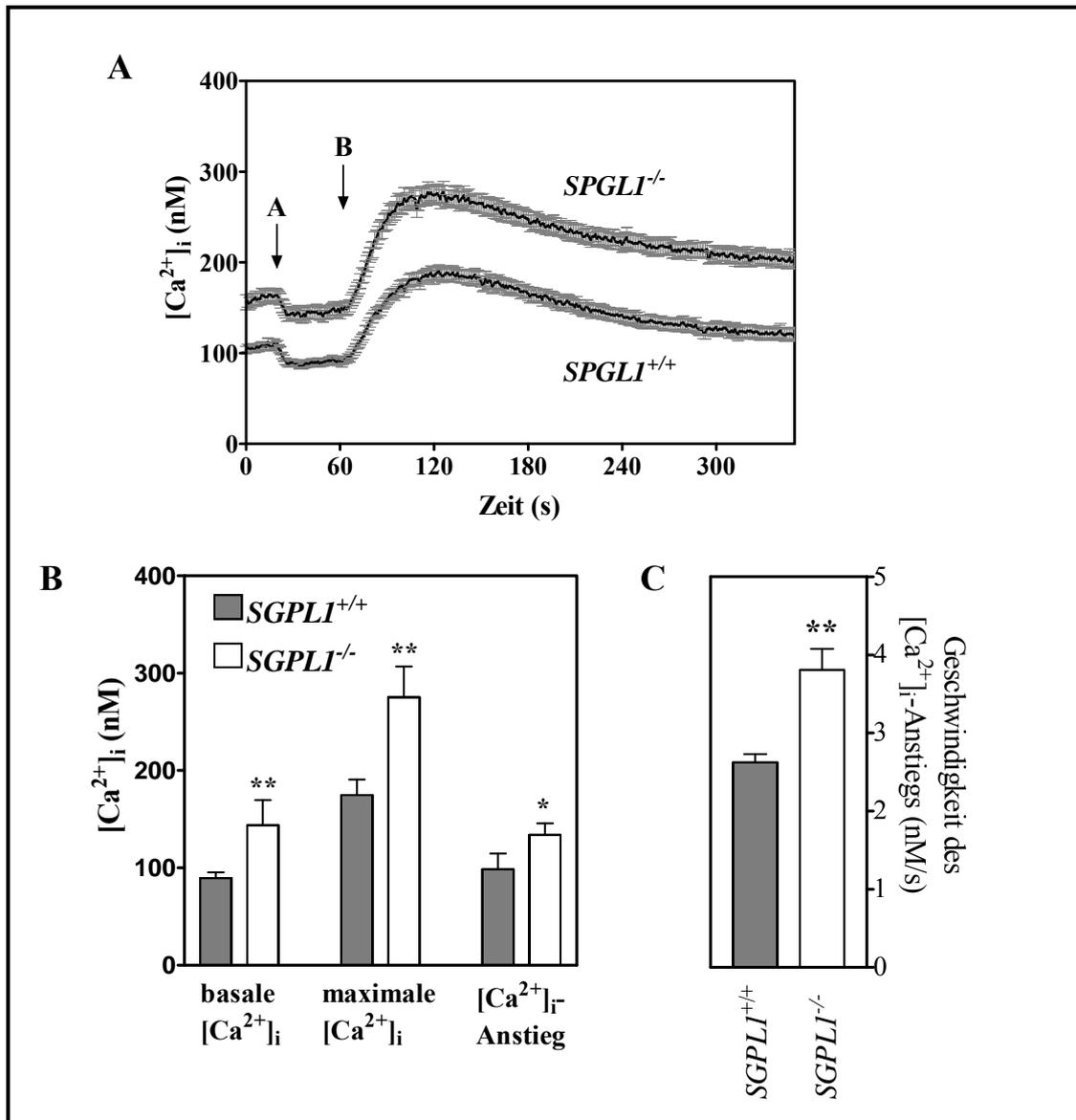


Abb. 26: Durch Thapsigargin ausgelöste [Ca²⁺]_i-Freisetzung in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ in SGPLI^{-/-}- und SGPLI^{+/+}-MEFs

A: Gezeigt sind die aus 16 Messungen in SGPLI^{-/-}-MEFs und 14 Messungen in SGPLI^{+/+}-MEFs gemittelten (\pm SEM) Zeitverläufe der [Ca²⁺]_i. Der Pfeil A zeigt den Zeitpunkt der Stimulation mit 50 mM EGTA und der Pfeil B zeigt den Zeitpunkt der Stimulation mit 1 μ M Thapsigargin. B und C: Gezeigt sind basale [Ca²⁺]_i, maximal erreichte [Ca²⁺]_i, [Ca²⁺]_i-Anstieg (B) sowie Geschwindigkeit der [Ca²⁺]_i (C) nach Stimulation mit Thapsigargin in SGPLI^{-/-} und SGPLI^{+/+}-MEFs. In B und C sind die Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Messungen gezeigt, die jeweils in Dreifachbestimmungen durchgeführt worden sind. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; je in *Two-Way ANOVA* gefolgt von *Bonferroni posttests*

4.3.3. Einfluss des SphK-Inhibitors SKI II auf die basale $[Ca^{2+}]_i$

Um zu untersuchen, ob das in den $SGPLI^{-/-}$ -MEFs angereicherte S1P (Veldhoven, 2005) bei der erhöhten basalen $[Ca^{2+}]_i$ in den $SGPLI^{-/-}$ -MEFs eine Rolle spielen könnte, wurde der Einfluss des SphK-Inhibitors SKI II (2-(p-Hydroxyanilin)-4-(p-chlorophenyl)thiazol) auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ untersucht. Hierfür wurden $SGPLI^{-/-}$ - und $SGPLI^{+/+}$ -MEFs über Nacht mit 30 μ M SKI II inkubiert. Die anschließende Messung wurde in Gegenwart von SKI II durchgeführt. Wie in Abb. 27 gezeigt, wurde die basale $[Ca^{2+}]_i$ der $SGPLI^{+/+}$ -MEFs durch SKI II nicht beeinflusst. Die basale $[Ca^{2+}]_i$ betrug in den mit SKI II vorbehandelten $SGPLI^{+/+}$ -MEFs 137 ± 14 nM und war damit nicht verschieden von der basalen $[Ca^{2+}]_i$, die in den mit Vehikel vorbehandelten Zellen gemessen wurde und 144 ± 10 nM betrug (Abb. 27). Dagegen wurde die basale $[Ca^{2+}]_i$ in den $SGPLI^{-/-}$ -MEFs durch die Vorinkubation mit SKI II signifikant auf 245 ± 28 nM vermindert, während die basale $[Ca^{2+}]_i$ in den Kontrollen mit 436 ± 32 nM unbeeinflusst hoch war (Abb. 27).

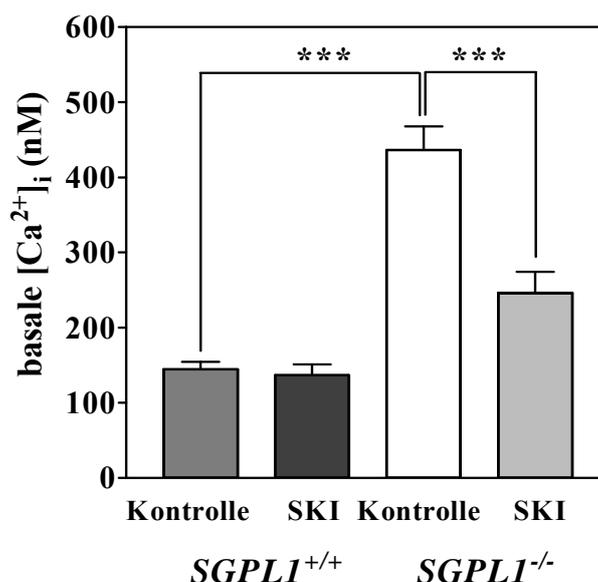


Abb. 27: Einfluss des SphK-Inhibitors SKI II auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration in $SGPLI^{-/-}$ - und $SGPLI^{+/+}$ -MEFs

Die Zellen wurden über Nacht mit 30 μ M SKI II oder Vehikel vorbehandelt. Danach wurde in den mit Fura-2 inkubierten Zellen die basale $[Ca^{2+}]_i$ bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=4$ unabhängigen Messungen. ***, $P < 0,001$ in *One-Way ANOVA* gefolgt von *Bonferroni's Multiple Test*

4.3.4. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der *SGPLI*^{-/-}-MEFs

Als Nächstes sollte die Ca²⁺-Homöostase in den *SGPLI*^{-/-}- und *SGPLI*^{+/+}-MEFs auf Einzelzell-Ebene mit Hilfe des Farbstoffes Fluo-4/AM weiter untersucht werden.

Nach der Inkubation der Zellen mit Fluo-4, wiesen die *SGPLI*^{+/+}-MEFs eine homogene Fluoreszenz auf, wie sie typisch für die Verteilung von Fluo-4 in Zellen ist. Fluo-4 hatte sich sowohl im Kern als auch im Cytosol der Zellen homogen verteilt, wobei die Fluoreszenz bei den meisten Zellen in den Kernen stärker ausgeprägt war als im Cytosol (Abb. 28 A). Die *SGPLI*^{-/-}-MEFs wiesen im Gegensatz dazu eine abnormale Fluo-4 Fluoreszenz auf (Abb. 28 B und C). Bestimmte subzelluläre Kompartimente im Cytosol und im perinukleären Raum zeigten eine deutlich verstärkte Fluoreszenz. Der Rest des Cytosols und die Kerne, wiesen eine deutlich geringere Fluoreszenz auf (Abb. 28 B und C).

Des Weiteren war die abnormale Fluo-4 Fluoreszenz nicht in allen *SGPLI*^{-/-}-MEFs gleich, sondern es zeigte sich, dass es zwei verschiedene Anfärbungsmuster innerhalb der *SGPLI*^{-/-}-MEFs gab. Das erste Muster zeichnete sich durch seine Lokalisierung ringsum den Kern aus, von der sich retikuläre Strukturen erhöhter Fluoreszenz weiter ins Cytosol der Zelle hinein erstreckten (Abb. 28 B). Beim anderen Fluoreszenzmuster traten eher punktartige Areale erhöhter Fluoreszenz auf, die sich über das gesamte Cytosol der Zellen verteilten (Abb. 28 C). In beiden Fällen war der Kern nicht von diesen erhöhten Fluoreszenzanfärbungen betroffen und unterschied sich deutlich von den mit Fluo-4 angefärbten Kernen der *SGPLI*^{+/+}-MEFs.

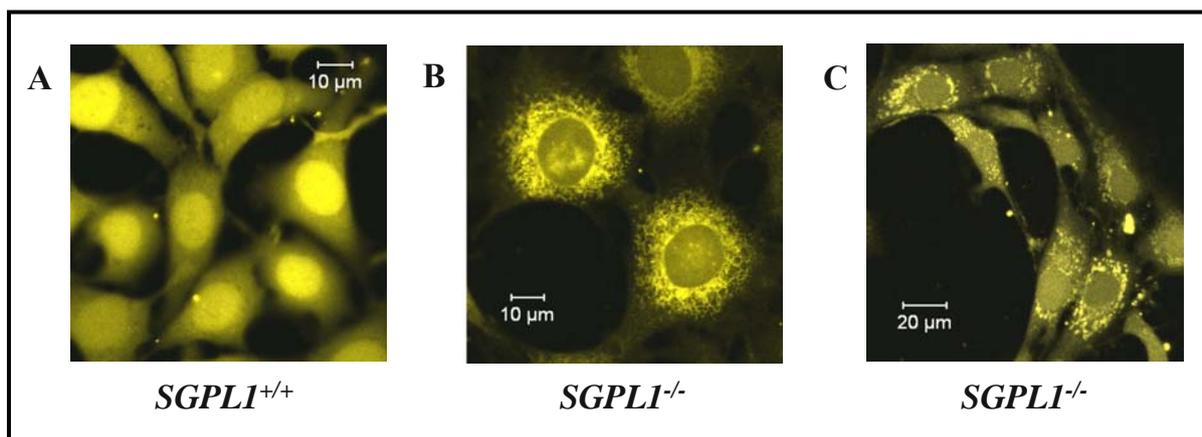


Abb. 28: Lokalisation des Ca²⁺-Indikators Fluo-4 in *SGPLI*^{-/-}- und *SGPLI*^{+/+}-MEFs

Die *SGPLI*^{+/+}- (A) und *SGPLI*^{-/-}-MEFs (B und C) wurden über Nacht in Serum-freien Medium inkubiert und vor der Messung mit 4 μM Fluo-4 für 30 min in HBSS inkubiert.

Um genauer zu untersuchen, um welche Zellorganellen es sich bei den stark fluoreszierenden Bereichen in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs handelte, wurde die Colokalisation der abnormalen Fluo-4 Anfärbungen mit sogenannten Organell-Markern untersucht. Dabei handelt es sich um Farbstoffe, die sich aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften in bestimmten Zellorganellen einlagern können. Aufgrund ihrer Fähigkeit zu fluoreszieren, färben sie dann bestimmte Zellorganellen spezifisch an.

Als Erstes wurde die Colokalisation der Fluo-4 Akkumulationen mit dem Farbstoff Tetramethylrhodamin untersucht, der sich potentialdifferenzabhängig in Mitochondrien einlagert. Dafür wurden die Zellen mit Fluo-4 und Tetramethylrhodamin inkubiert und getrennt voneinander im Multikanal-Modus eines konfokalen Laserscanning-Mikroskop gemessen. Weder die durch Fluo-4 stark fluoreszierenden, retikulären Zellkompartimente (Abb. 29 A), noch die punkartigen Fluo-4 Anfärbungen colokalisierten mit dem in den Mitochondrien angereicherten Tetramethylrhodamin (Abb. 29 B). Diese Unterschiede deuteten darauf hin, dass es sich bei den durch Fluo-4 verstärkt angefärbten Organellen nicht um Mitochondrien handelte.

Um diese Ergebnisse zu unterstützen, wurden die mit Fluo-4 und Tetramethylrhodamin inkubierten *SGPLI*^{-/-}-MEFs mit dem Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette FCCP stimuliert. Sollten die gesehenen Fluoreszenzen in den Mitochondrien lokalisiert sein, so müssten sie durch die Stimulation der Zellen mit FCCP vermindert werden und die Farbstoffe ausgewaschen werden können. Wie in Abb. 29 C gezeigt, war bereits 10 s nach der Zugabe des FCCP eine stark diffuse und verminderte Tetramethylrhodamin Anfärbung zu beobachten. Innerhalb von 5 min war das Tetramethylrhodamin vollkommen aus den Mitochondrien gewaschen und dessen Fluoreszenz konnte nicht mehr detektiert werden (nicht gezeigt). Die abnormalen Fluo-4 Anfärbungen wurden jedoch nicht durch die FCCP-Stimulation beeinflusst und blieben unverändert (Abb. 29 C).

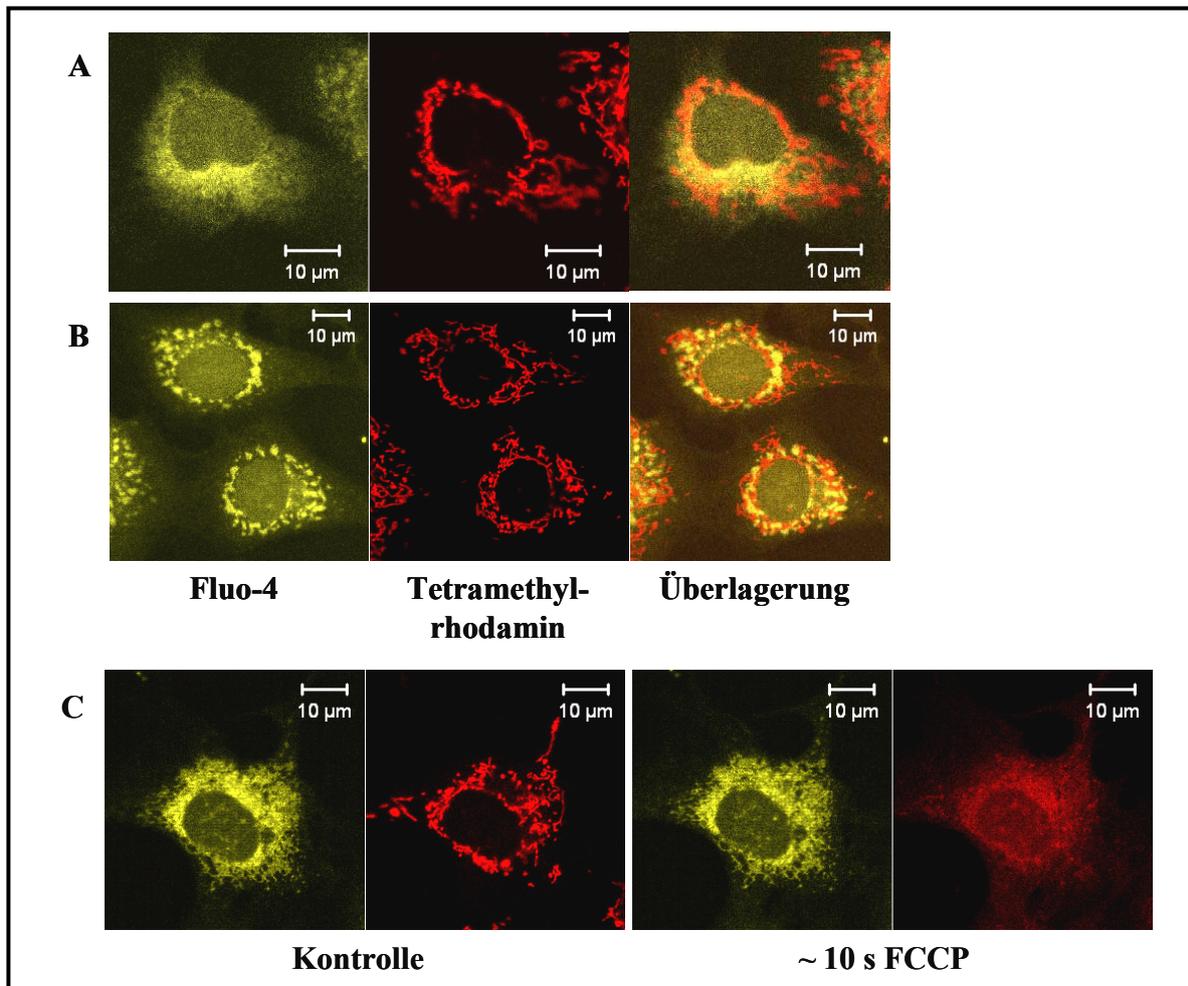


Abb. 29: Colokalisation von Fluo-4 und Tetramethylrhodamin in *SGPL1*^{-/-}-MEFs

Die Zellen wurden für 30 min mit 4 µM Fluo-4 und 1 µM Tetramethylrhodamin in HBSS inkubiert. Danach wurden sie mit HBSS gewaschen und die Fluoreszenzen der beiden Farbstoffe separat voneinander im konfokalen Laserscanning-Mikroskop betrachtet und überlagert. A zeigt die Colokalisation der netzartigen Fluo-4 Anfärbung (gelbe Fluoreszenz) mit Tetramethylrhodamin (rote Fluoreszenz) in einer repräsentativen Zelle. B zeigt den Vergleich der punktuellen Fluo-4 Anfärbung (gelbe Fluoreszenz) mit der des Tetramethylrhodamins in einer repräsentativen Zelle. C: Die Bildserie zeigt eine mit Fluo-4 und Tetramethylrhodamin (rote Fluoreszenz) inkubierte, repräsentative Zelle vor und 10 s nach Stimulation mit 10 µM FCCP.

In einer weiteren Untersuchung wurden die *SGPLI*^{-/-}-MEFs mit Fluo-4 und *ER Tracker Blue white DPX*, einem fluoreszierenden Marker des ER inkubiert. Beim Vergleich der intrazellulären Fluo-4 Fluoreszenzen fiel auf, dass die retikuläre Fluo-4 Anfärbung mit der Anfärbung des ER Markers in vielen Zellbereichen gut übereinstimmte (Abb. 30 A). Dies deutete darauf hin, dass Fluo-4 in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs abnormal im ER gespeichert werden könnte. Jedoch unterschied sich die punktuelle Fluo-4 Anfärbung deutlich von der des ER-Markers (Abb. 30 B).

Um eine mögliche Fluo-4 Anreicherung in Lysosomen zu untersuchen, wurden Colokalisationsexperimente mit dem Lysosomen-Marker *Lyso Tracker Red DND 99* durchgeführt. Die Abb. 30 C zeigt ein repräsentatives Ergebnis dieser Untersuchung. Deutlich ist zu erkennen, dass die punktuellen, abnormalen Fluo-4 Anfärbungen sehr gut mit dem Lyso-Marker colokalisierten.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Thapsigargin auf die abnormale Speicherung von Fluo-4 in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs untersucht. Wie die Abb. 31 A und 31 B zeigen, verminderte die Stimulation mit Thapsigargin die abnormale, netzartige und punktuelle Verteilung des Fluo-4 Farbstoffes. Der durch Thapsigargin ausgelöste $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war durch die erhöhte Fluo-4 Fluoreszenz im Cytosol und Kern erkennbar. Die Stimulation der *SGPLI*^{-/-}-MEFs mit dem Vehikel beeinflusste die erhöhten Fluo-4 Fluoreszenzen in den Kompartimenten jedoch nicht (Abb. 31 C).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs eine abnormale, Thapsigargin-sensitive Speicherung des Fluoreszenzindikators Fluo-4 in Lysosomen und ER zu beobachten war.

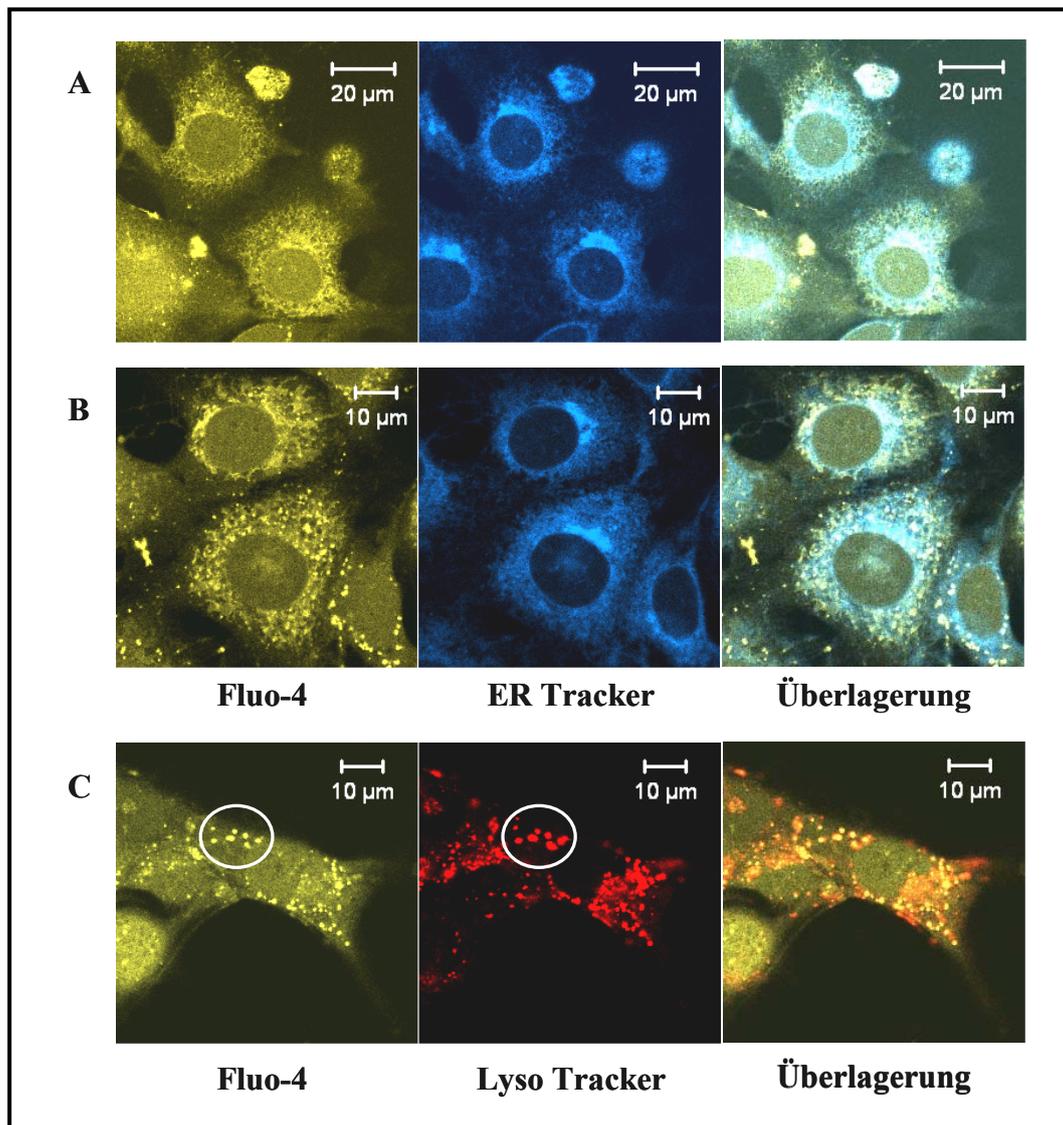


Abb. 30: Colokalisation von Fluo-4 mit ER Tracker und Lyso Tracker in *SGPL1*^{-/-}-MEFs

Die Zellen wurden für 30 min mit 4 μM Fluo-4 und 500 nM ER Tracker Blue White DPX oder mit 500 nM Lyso Tracker Red DND 99 in HBSS inkubiert. Danach wurden die Fluoreszenzen der Farbstoffe separat voneinander im konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen und überlagert. A zeigt die Colokalisation der netzartigen Fluo-4 Anfärbung (gelbe Fluoreszenz) mit dem ER Tracker (blaue Fluoreszenz) in repräsentativen Zellen. In B ist die Colokalisation der vorwiegend punktuellen Fluo-4 Anfärbung mit dem ER Tracker in repräsentativen Zellen gezeigt. C zeigt den Vergleich der punktuellen Fluo-4 Anfärbung mit der des Lyso Trackers (rote Fluoreszenz) in repräsentativen Zellen. Die Kreise markieren Regionen, in welchen die Colokalisation von Fluo-4 und dem Lysosomen-Marker besonders auffiel.

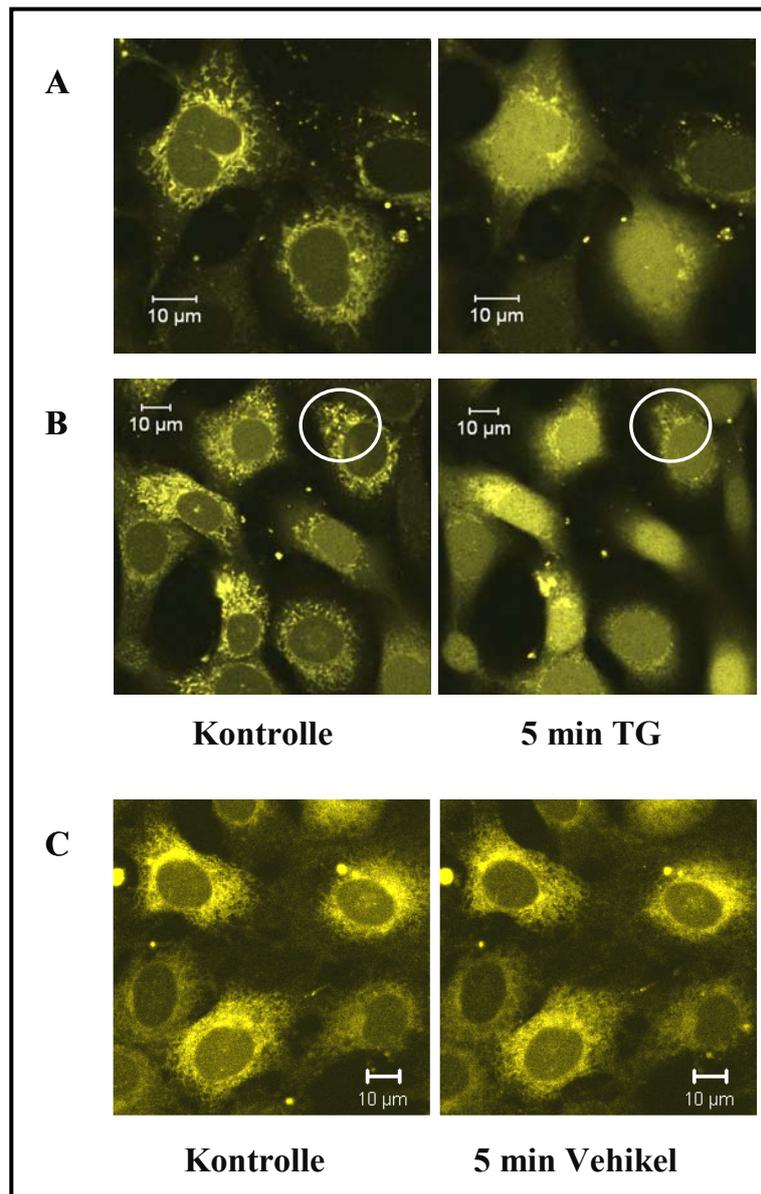


Abb. 31: Einfluss von Thapsigargin auf die lokal erhöhte Fluo-4 Fluoreszenz in den *SGPL1*^{-/-}-MEFs

Die Zellen wurden für 30 min mit 4 μM Fluo-4 in HBSS inkubiert, gewaschen und im konfokalen Laserscanning Mikroskop gemessen. Die Bildserien zeigen jeweils repräsentative Zellen vor und 5 min nach Stimulation mit 1 μM Thapsigargin (TG) (A und B) bzw. nach Stimulation mit dem Vehikel (C).

4.4. Wirkung des Sphingosin-Analogons cis-4-MSph in HEK-293-Zellen

Mit cis-4-MSph stand eine chemisch-synthetische Substanz zur Verfügung, die intrazellulär durch SphKs zum metabolisch stabilen cis-4-MS1P phosphoryliert wird (van Echten-Deckert *et al.*, 1997). Im Gegensatz zum kurzlebigen S1P, wird das cis-4-MS1P aufgrund seiner S1P-Lyase-Unempfindlichkeit in den Zellen angereichert und imitiert die durch S1P vermittelten Wirkungen (van Echten-Deckert *et al.*, 1998). Diese Wirkungen, wie z. B. Proliferation oder DNA-Synthese, korrelieren zumindest zum Teil mit der S1P-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern von Zellen (Zhang *et al.*, 1991; van Echten-Deckert *et al.*, 1998). Die akute Stimulation von Swiss 3T3-Fibroblasten mit cis-4-MSph induzierte ebenfalls eine Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern der Zellen (van Echten-Deckert *et al.*, 1998). Daher sollte untersucht werden, ob das intrazellulär angereicherte cis-4-MS1P die S1P-Lyase Defizienz imitieren könnte und einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase in HEK-293-Zellen hat.

4.4.1. Durch cis-4-MSph ausgelöste $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege

Als Erstes sollten die durch cis-4-MSph ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in HEK-293-Zellen untersucht und mit den durch Sphingosin und S1P ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegen verglichen werden. Dazu wurden die Zellen mit Fura-2 inkubiert und die durch S1P, Sphingosin und cis-4-MSph ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege im Fluoreszenz-Spektrophotometer gemessen. Repräsentative Zeitverläufe sind in der Abb. 32 A dargestellt. Die akute Stimulation mit 10 μM cis-4-MSph induzierte in HEK-293-Zellen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege um 110 ± 20 nM. Die durch S1P induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege waren etwas höher und betragen 140 ± 31 nM, während 10 μM Sphingosin $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege um 92 ± 27 nM induzierte und damit den durch cis-4-MSph induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegen entsprachen.

Die durch S1P, Sphingosin und cis-4-MSph ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Kinetik. Während die Stimulation der Zellen mit S1P sehr rasch zu einem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg führte, erfolgten die durch Sphingosin und cis-4-MSph ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege deutlich verzögert und langsamer (Abb. 32 A). Cis-4-MSph vermittelte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege mit einer Geschwindigkeit von $2,1 \pm 0,5$ nM/s und war damit signifikant schneller als die durch Sphingosin induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege, die um $1 \pm 0,3$ nM/s anstiegen (Abb. 32 B). Auch die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abnahme zurück zur basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verlief nach der Stimulation mit cis-4-MSph deutlich langsamer als nach Stimulation mit S1P, wobei sie jedoch schneller verlief als nach der Stimulation mit Sphingosin (nicht gezeigt).

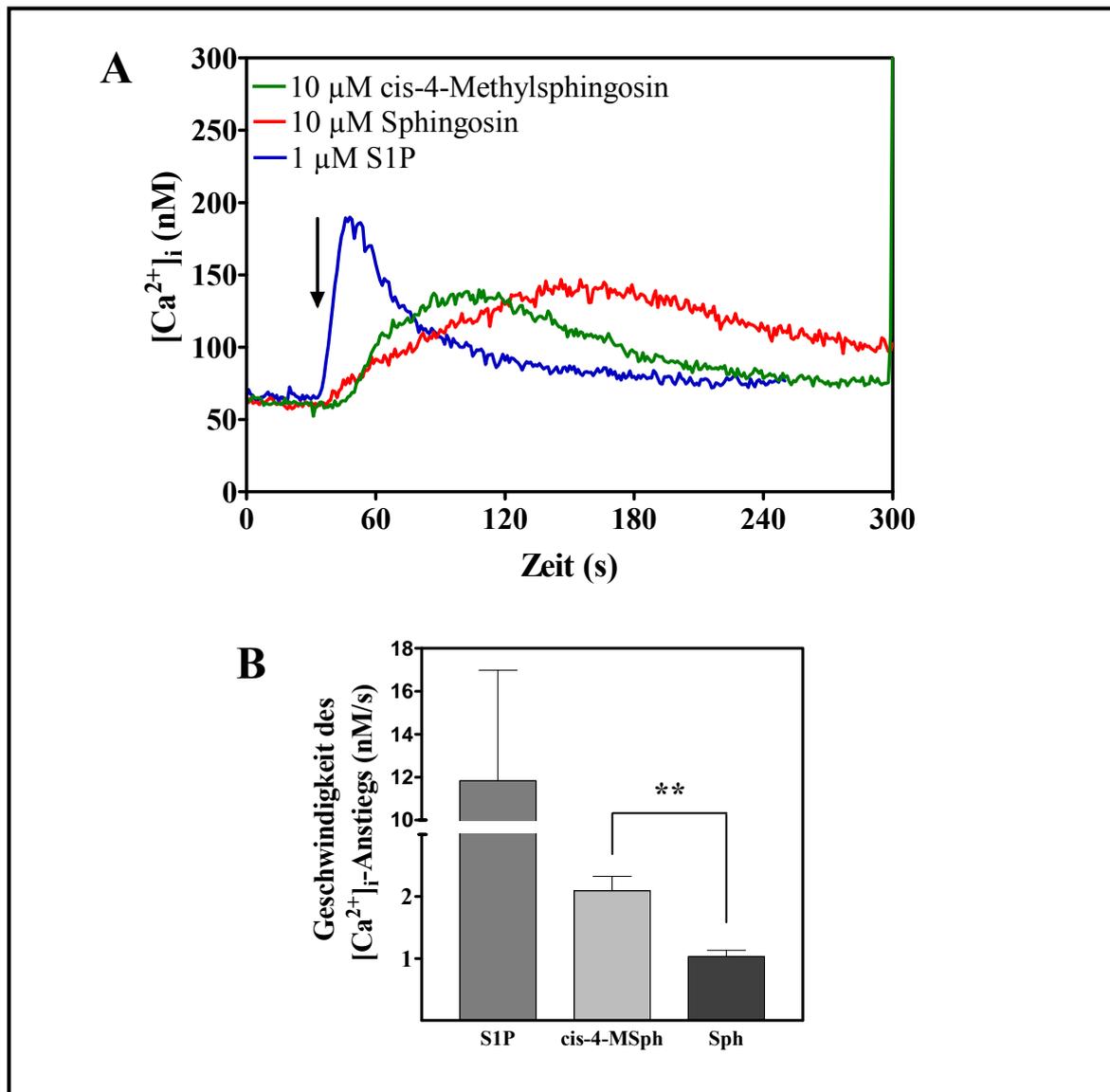


Abb. 32: Durch cis-4-MSph ausgelöste $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden einen Tag vor der Messung in Serum-freiem Medium inkubiert. Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden mit S1P, Sphingosin (Sph) und cis-4-MSph stimuliert. A zeigt repräsentative Zeitverläufe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor und nach der Stimulation. Der abgebildete Pfeil weist auf den Zeitpunkt der Stimulation hin. B: Geschwindigkeit der durch S1P, Sphingosin und cis-4-MSph ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege. In B sind die Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experimentes dargestellt, welches in vierfach-Werten durchgeführt wurde. **, $P < 0,01$ in *One-Way ANOVA* gefolgt von *Bonferroni's Multiple Test*

4.4.2. Einfluss des cis-4-MSph auf die durch Agonisten induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege

Als Nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss eine längere Inkubation mit cis-4-MSph auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ und auf die durch Agonisten induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege haben könnte. Hierfür wurden die Zellen mit Fura-2 inkubiert und der Einfluss des cis-4-MSph auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ sowie auf die durch S1P und LPA induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege untersucht. Die Vorbehandlung der Zellen mit cis-4-MSph führte zu einer signifikanten und nahezu vollständigen Hemmung der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch S1P (Abb. 33 A). Die Vorinkubation mit Sphingosin führte hingegen zu keiner signifikanten Hemmung der durch S1P vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege (Abb. 33 A). Die basale $[Ca^{2+}]_i$ wurde durch die Inkubation mit cis-4-MSph nicht beeinflusst (Abb. 33 A). Die durch das S1P-verwandte Lysophospholipid LPA ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden durch die Vorinkubation mit cis-4-MSph jedoch nicht beeinflusst (Abb. 33 A).

Zum Vergleich wurden HEK-293-Zellen auch mit dem Sphingosin-Analogon FTY720, das sich in klinischen Studien zur Behandlung der Multiplen Sklerose befindet, für 16 h vorbehandelt. Die Vorinkubation mit FTY720 hemmte, im Gegensatz zur Vorbehandlung mit cis-4-MSph, nicht die durch S1P vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und hatte auch keinen Einfluss auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ oder auf die durch LPA ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege (Abb. 33 B).

Da beschrieben worden war, dass sich cis-4-MS1P und nicht das unphosphorylierte cis-4-MSph intrazellulär anreichert (van Echten-Deckert *et al.*, 1997), wurde mit Hilfe von embryonalen Fibroblasten aus SphK1-defizienten Mäusen (*SPHK1*^{-/-}-MEFs) die Rolle der SphK1 bei der Hemmwirkung von cis-4-MSph untersucht. Dazu wurden die *SPHK1*^{-/-}-MEFs und Wildtyp-Mausfibroblasten (*SPHK1*^{+/+}-MEFs) über Nacht mit cis-4-MSph vorinkubiert und die durch S1P induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege untersucht. Die in den *SPHK1*^{+/+}-MEFs durch S1P induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden, im Vergleich zu den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen, in den mit Vehikel behandelten Zellen, durch die Vorinkubation mit cis-4-MSph deutlich um 74 % gehemmt (Abb. 34). Im Gegensatz dazu induzierte die cis-4-MSph-Vorinkubation in den *SPHK1*^{-/-}-MEFs eine wesentlich geringere Hemmung der durch S1P induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege (Abb. 34). In den *SPHK1*^{-/-}-MEFs wurden die S1P-vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege im Vergleich zu den Anstiegen in den mit Vehikel behandelten Zellen lediglich um 34 % gehemmt (Abb. 34). Folglich war die Hemmwirkung des cis-4-MSph abhängig von der Expression der SphK1 und deshalb sehr wahrscheinlich durch cis-4-MS1P ausgelöst.

Da es möglich war, dass cis-4-MSph als kompetitiver Antagonist an S1P-Rezeptoren wirken könnte, wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von cis-4-MSph für

kurze (5 min) und lange (16 h) Inkubationszeiten bestimmt. Die Inkubation mit cis-4-MSph für 16 h inhibierte die durch S1P ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege deutlich stärker als die Inkubation für 5 min (Abb. 35). Dabei induzierte die Inkubation für 16 h eine deutliche Rechtsverschiebung der cis-4-MSph-Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 35). Der Vergleich der cis-4-MSph-Konzentrations-Wirkungskurven nach akuter Zugabe und Langzeitinkubation von cis-4-MSph deuteten also darauf hin, dass die inhibierende Wirkung des cis-4-MSph auf die durch S1P ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege zeitabhängig war und sich mit der Zeit verstärkte. Dies spricht gegen einen kompetitiven Antagonismus.

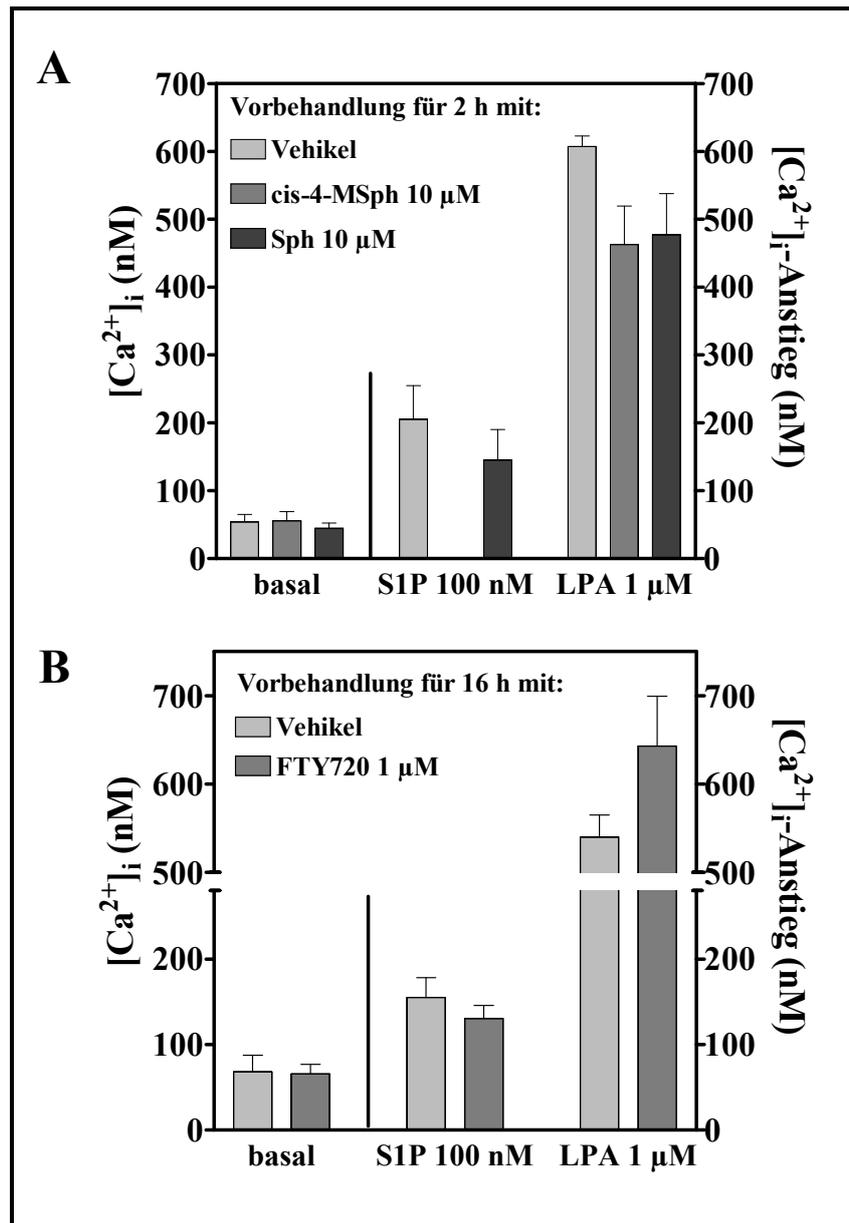


Abb. 33: Einfluss der Sphingosin-Analoga cis-4-Msph und FTY720 auf die durch S1P induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden für 2 h mit cis-4-Msph (A) und 16 h mit 1 μM FTY720 (B) inkubiert und anschließend mit Fura-2 beladen. In A und B ist auf der linken y-Achse die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dargestellt. Auf der rechten y-Achse sind die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege durch 100 nM S1P bzw. 1 μM LPA aufgetragen. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte \pm SD einer repräsentativen Messung (A: n=3; B: n=4).

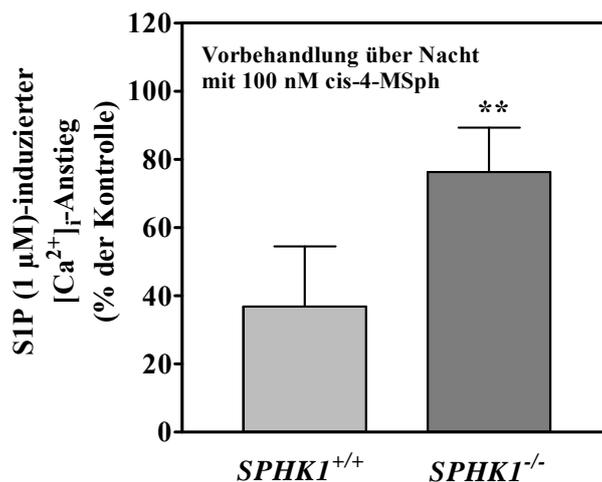


Abb. 34: Hemmung der S1P-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch cis-4-MSPh in den $SPHK1^{-/-}$ - und $SPHK1^{+/+}$ -MEFs

$SPHK1^{-/-}$ - und $SPHK1^{+/+}$ -MEFs wurden über Nacht mit 100 nM cis-4-MSPh inkubiert und anschließend mit 1 µM Fura-2 beladen. Die durch 1 µM S1P ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden spektrofluorometrisch bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte \pm SD einer repräsentativen Messung (n=3). **, $P < 0,01$ im *One-sample-t-test*

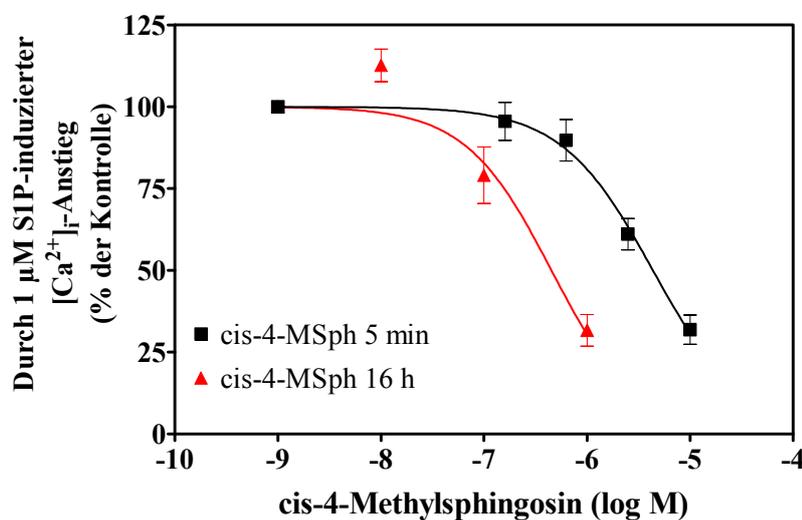


Abb. 35: Konzentrations-Wirkungskurve der Hemmung des S1P-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieges durch cis-4-MSPh

Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von cis-4-MSPh für 5 min oder 16 h inkubiert und die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch 1 µM S1P gemessen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM von 5 Messwerten pro Konzentrationsschritt.

4.4.3. Einfluss des cis-4-MSph auf die Lokalisation der S1P-Rezeptoren

Aus den oben dargestellten Ergebnissen ergab sich die Frage, wie das cis-4-MSph bei der Langzeitinkubation mechanistisch die durch S1P induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege inhibierte. Die Idee dazu war, dass das intrazellulär angereicherte cis-4-MS1P aus den Zellen exportiert werden könnte und dann die in der Plasmamembran der Zellen lokalisierten S1P-Rezeptoren aktivieren und letztlich desensibilisieren könnte. Da bekannt ist, dass die S1P-Rezeptoren S1P₂ und S1P₃ in HEK-293-Zellen Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ vermitteln, könnte durch die Desensibilisierung dieser Rezeptoren der inhibierende Effekt des cis-4-MSph auf die S1P-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ erklärt werden.

Um dies zu untersuchen, wurden die HA-gekoppelten S1P-Rezeptoren S1P₂ und S1P₃ in HEK-293-Zellen überexprimiert. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht mit cis-4-MSph, S1P und dem Sphingosin-Analogen FTY720 vorbehandelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen fixiert und immungefärbt. Im konfokalen Laserscanning-Mikroskop wurde die Lokalisation der Rezeptoren untersucht. Wie in Abb. 36 gezeigt ist, war der S1P₂-Rezeptor in den mit Vehikel vorbehandelten Zellen vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert. Exogenes S1P internalisierte den S1P₂-Rezeptor hingegen größtenteils (Abb. 36). Die Inkubation mit cis-4-MSph induzierte eine Internalisierung des S1P₂-Rezeptors, wobei das Ausmaß dieser Rezeptorinternalisierung mit der durch S1P induzierten Internalisierung zu vergleichen war (Abb. 36). Die Inkubation mit FTY720 hatte, wie in der Literatur bereits beschrieben, keinen Einfluss auf die Lokalisation des S1P₂-Rezeptors (Abb. 36). Der S1P₃-Rezeptor wurde sowohl durch exogenes S1P, als auch durch die Inkubation mit cis-4-MSph und FTY720 größtenteils internalisiert (Abb. 36). Dabei war in einer Vielzahl der beobachteten Zellen eine gewisse Anzahl von Rezeptoren noch in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 36). In den mit Vehikel vorbehandelten Zellen befand sich der Rezeptor überwiegend in der Plasmamembran (Abb. 36).

Nun stellte sich die Frage, ob cis-4-MSph ebenfalls eine Internalisierung des S1P₁-Rezeptors auslösen könnte. Dafür wurden HEK-293-Zellen mit S1P₁-GFP transfiziert und über Nacht mit cis-4-MSph, S1P und FTY720 inkubiert. Die fixierten Zellen wurden im konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Sowohl durch S1P als auch durch FTY720 wurde der S1P₁-Rezeptor größtenteils internalisiert (Abb. 36). Der S1P₁-Rezeptor wurde auch durch die Inkubation mit cis-4-MSph internalisiert, jedoch war, anders als bei den mit FTY720 und S1P vorbehandelten Zellen, ein Großteil des Rezeptors weiterhin in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 36).

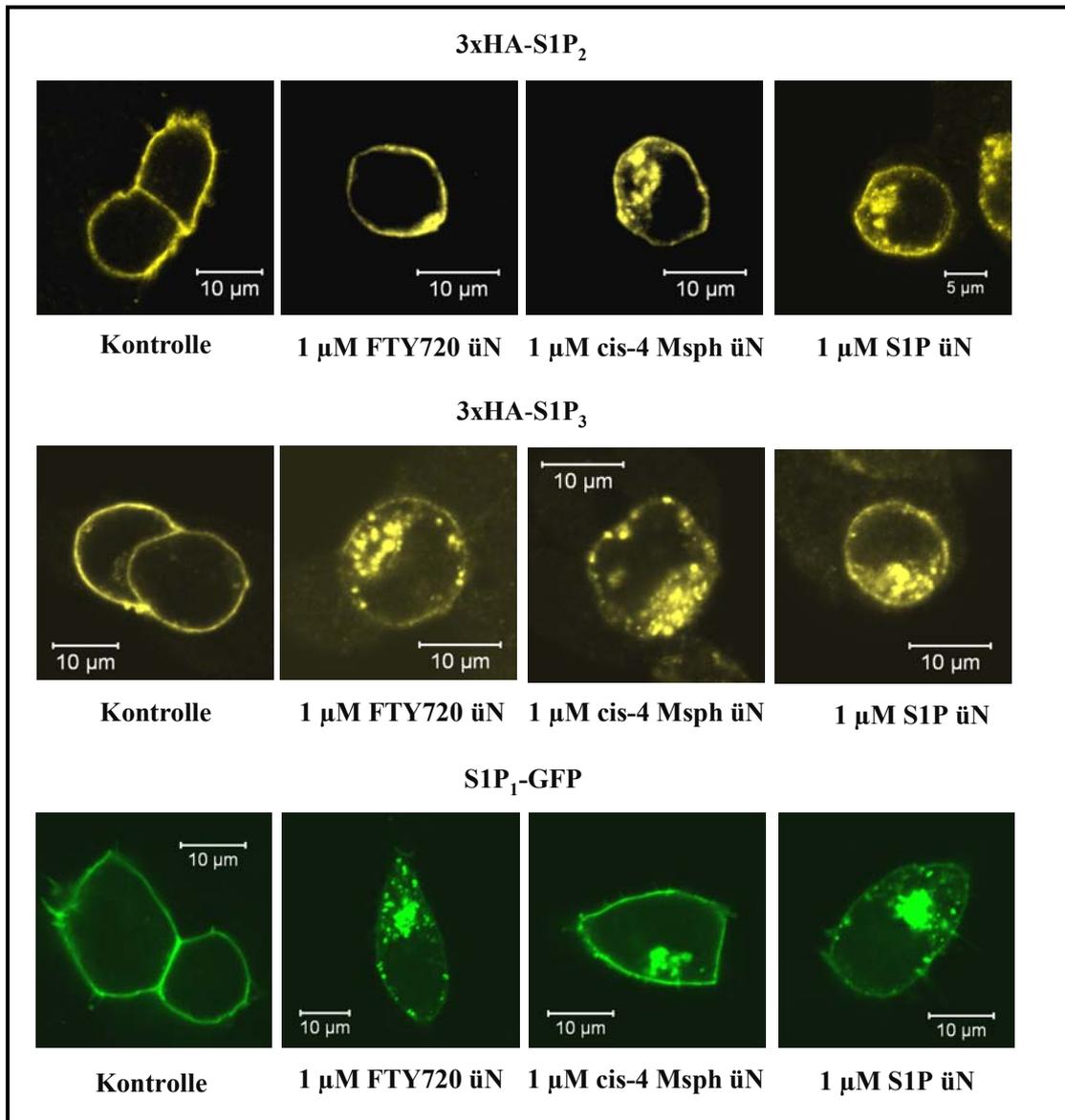


Abb. 36: Durch cis-4-MSph induzierte Internalisierung der S1P-Rezeptoren S1P₂, S1P₃ und S1P₁ in HEK-293-Zellen

Die Bildserie zeigt mit Vehikel, 1 μM S1P, 1 μM FTY720 und 1 μM cis-4-MSph vorbehandelte Zellen. Die Zellen wurden mit 3xHA-S1P₂, 3xHA-S1P₃ und S1P₁-GFP transfiziert, über Nacht in Medium ohne FKS inkubiert und mit Vehikel, FTY720, cis-4-MSph und S1P vorbehandelt. Danach wurden die Zellen fixiert und die mit 3xHA-S1P₂ und 3xHA-S1P₃ transfizierten Zellen immungefärbt.

5. Diskussion

5.1. Mechanismus der durch den M₃-Rezeptor stimulierten SphK1-Translokation

Im Vorfeld der Arbeit war gezeigt worden, dass die Stimulation G_q-gekoppelter Rezeptoren nicht nur zu einer Steigerung der SphK-Aktivität führt, sondern auch eine rasche und lang anhaltende Translokation der SphK1 an die Plasmamembran induziert (Danneberg, 2003). Der Signaltransduktionsweg, der die SphK1-Translokation vermittelt, verläuft dabei spezifisch über G α_q , was Danneberg (2003) durch Expression verschiedener konstitutiv aktiver G α -Untereinheiten zeigen konnte. Klassische G_q-Signalwege verlaufen über die Aktivierung von PLC β -Isoformen, die eine Hydrolyse von PIP₂ katalysieren, wobei die *second messenger* IP₃ und DAG entstehen. IP₃ induziert die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, während DAG eine Vielzahl von Effektoren aktiviert, insbesondere die klassischen und neuen Isoformen der PKC (Yuan *et al.*, 2005). Danneberg (2003) hatte insbesondere die Translokation der murinen, an YFP-gekoppelten SphK1 nach Stimulation des M₃-Rezeptors in HEK-293-Zellen untersucht. Diese Translokation war unabhängig von einem [Ca²⁺]_i-Anstieg, einer Entleerung der Ca²⁺-Speicher, einer Aktivierung der PKC, einer Tyrosinphosphorylierung, vom Aktin-Cytoskelett und von der katalytischen Aktivität der SphK1 (Danneberg, 2003).

Eine durch den M₃-Rezeptor stimulierte SphK1-Translokation war zuvor in SH-SY5Y-Zellen beschrieben worden (Young *et al.*, 2003), jedoch war diese Translokation anders reguliert als in HEK-293-Zellen. So konnte sie durch Thapsigargin stimuliert und durch den Calmodulin-Inhibitor W7 gehemmt werden und war folglich abhängig von Ca²⁺/Calmodulin (Young *et al.*, 2003). In HEK-293-Zellen dagegen induzierte Thapsigargin keine SphK1-Translokation, und die durch Carbachol induzierte Translokation wurde nicht durch W7 gehemmt (Danneberg, 2003). Damit war gezeigt worden, dass dem M₃-Rezeptor ein nicht auf Ca²⁺/Calmodulin beruhender Mechanismus für die Translokation der SphK1 in HEK-293-Zellen zur Verfügung steht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der molekulare Mechanismus der durch G_q-gekoppelte Rezeptoren induzierten SphK1-Translokation näher charakterisiert und ihre funktionelle Bedeutung identifiziert werden.

Zunächst wurde dabei gezeigt, dass nicht nur die murine, sondern auch die humane SphK1 in HEK-293-Zellen nach Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol massiv vom Cytosol an die Plasmamembran translozierte. Hierbei wurde eine Halbwertszeit von ca. 3-4 s festgestellt.

Auch in glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta (A10-Zelllinie; diese Arbeit) oder in mikrovaskulären Endothelzellen (Bend-3-Zelllinie; Mulders, 2007) konnte eine M_3 -stimulierte Translokation der SphK1 beobachtet werden. Die Untersuchungen mit konstitutiv aktiven G-Protein- α -Untereinheiten konnten bestätigt und ergänzt werden, indem gezeigt wurde, dass auch ein anderes Mitglied der G_q -Familie, nämlich $G\alpha_{11}$, eine Translokation der SphK1 an die Plasmamembran auslösen konnte.

Der Mechanismus der SphK1-Translokation ist bisher vor allem für das Cytokin TNF- α und den PKC-Aktivator PMA näher untersucht worden. So war die durch TNF- α und PMA induzierte Aktivierung und Translokation der humanen SphK1 an die Plasmamembran von einer Phosphorylierung des Ser²²⁵ durch eine ERK-ähnliche Kinase abhängig (Pitson *et al.*, 2003). Weitere Untersuchungen führten zur Hypothese, dass durch die Phosphorylierung über elektrostatische Wechselwirkungen oder eine Konformationsänderung die Phosphatidylserin-Bindungsstellen der SphK1 freigelegt werden könnten. Diese Bindungsstellen waren für die Membranverankerung der SphK1 essentiell (Stahelin *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die durch Stimulation des M_3 -Muskarinrezeptors induzierte Translokation der humanen SphK1 unabhängig von der Phosphorylierung des Ser²²⁵ war. Die SphK1-Mutante SphK1^{S225A} translozierte mit der gleichen Kinetik wie die Wildtyp-SphK1 an die Plasmamembran. Für die murine SphK1 war bereits von Danneberg (2003) festgestellt worden, dass ihre Translokation nach M_3 -Rezeptor-Stimulation nicht durch PMA imitiert werden und nicht durch PKC-Inhibitoren gehemmt werden konnte. Wie weiter unten dargestellt, ließ sich auch die Translokation der humanen SphK1 nach M_3 -Rezeptor-Stimulation nicht durch PMA imitieren. Folglich beruhte die Translokation der SphK1 nach Stimulation des M_3 -Rezeptors auf einem anderen Mechanismus als die Translokation nach Stimulation mit TNF- α oder PMA.

Die Aminosäuresequenz der humanen SphK1 enthält verschiedene putative posttranslationale Modifikationsstellen, wie z. B. N-Myristoylierungsstellen oder auch eine Glykosylierungsstelle, die an der Regulation der SphK1-Aktivität und deren Lokalisation beteiligt sein könnten (Taha *et al.*, 2006). Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat stellen wichtige posttranslationale Modifikatoren einer ganzen Reihe von Proteinen dar, zu denen unter anderem auch heterotrimere G-Proteine und die GTPasen Ras, Rho, Rap und Rab gehören (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). Diese GTPasen werden durch Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat isoprenyliert, was entscheidend für ihre Membranverankerung und Aktivierung ist. Statine inhibieren die

Synthese der beiden Isoprenoid-Zwischenprodukte Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat (Goldstein und Brown, 1990). Die Vorbehandlung von HEK-293-Zellen mit Simvastatin hatte jedoch keinen Einfluss auf die durch Carbachol induzierte Translokation der SphK1, welche folglich nicht auf einer Farnesylierung oder Geranylierung beruhte.

Da eine Stimulation des M₃-Rezeptors nicht nur eine Translokation der SphK1 bewirkt, sondern auch eine Translokation von PKC-Isoformen und Proteinkinase D (PKD; Rozengurt *et al.*, 2005), sollten diese Vorgänge miteinander verglichen werden. Die Translokation der SphK1 war deutlich langsamer als die der PKC- α , jedoch über Stunden stabil, während die Translokation der PKC- α innerhalb von Sekunden reversibel war. Die Translokation der PKC- α wird durch die Bildung von DAG in der Plasmamembran induziert, an das die PKC- α mit ihrer C1-Domäne bindet. Die Ca²⁺-Freisetzung durch den anderen *second messenger* IP₃ induziert die Bindung von Ca²⁺ an die C2-Domäne der PKC- α , welche durch deren Ca²⁺-abhängige Bindung an anionische Lipide zum großen Teil für die Initiation der Membran-Assoziation der PKC- α verantwortlich ist (Carmena und Sardini, 2007; Sinnecker und Schäfer, 2004). Die Bindung von DAG induziert dann die Freisetzung des im inaktiven Zustand gebundenen Pseudosubstrats, und die PKC- α geht in einen aktiven Zustand über, kann ihr Substrat binden und Signaltransduktionsprozesse initiieren. Entsprechend induzierte die Steigerung der [Ca²⁺]_i durch Ionomycin eine Retranslokation der PKC- α , während Ionomycin keinen Einfluss auf die stabil an der Plasmamembran lokalisierte SphK1 hatte. Ionomycin transportiert Ca²⁺-Ionen frei durch die Plasmamembran, wodurch im Zellinnern die Ca²⁺-Konzentration der extrazellulären Pufferlösung erreicht wird. Die durch Carbachol induzierte Translokation der PKC- α unterschied sich damit deutlich von der SphK1-Translokation.

Die im Ruhezustand cytosolisch lokalisierten Enzyme SphK1 und PKD translozierten nach Stimulation mit Carbachol mit den unterschiedlichen Halbwertszeiten von ca. 3 s für die SphK1 bzw. ca. 12 s für die PKD an die Plasmamembran von HEK-293-Zellen. Die Translokation beider Enzyme war lang anhaltend. Die M₃-stimulierte PKD-Translokation wird wahrscheinlich durch die direkte Bindung der C1-Domäne der PKD an DAG und eine direkte oder indirekte Aktivierung durch die PKC induziert (Rozengurt *et al.*, 2005). In Übereinstimmung damit induzierte auch PMA eine stark ausgeprägte und lang anhaltende Translokation der PKD an die Plasmamembran, wobei die Halbwertszeit etwa 15 s betrug. Die Translokation der humanen SphK1 nach Stimulation mit PMA war dagegen höchstens

gering ausgeprägt und konnte durch die nachfolgende Stimulation der Zellen mit Carbachol deutlich und rasch verstärkt werden. Auch eine kombinierte Stimulation mit PMA und Ionomycin induzierte nur eine sehr schwache Translokation der SphK1 und hatte keinen hemmenden Einfluss auf die nachfolgende durch Carbachol induzierte Translokation. Dies weist darauf hin, dass auch die Kombination aus einer persistent hohen $[Ca^{2+}]_i$ und einer PKC-Aktivierung, falls überhaupt, nur einen sehr geringen Einfluss auf die Lokalisation der SphK1 hat, während die M_3 -stimulierte Translokation unabhängig von diesen Vorgängen abläuft. Insgesamt unterschied sich die Translokation der SphK1 also von der Translokation der PKC- α und der PKD, was dazu passt, dass die Aminosäuresequenz der SphK1 weder C1- noch C2-Domänen enthält (Taha *et al.*, 2006).

Über die Klonierung und Expression von Fragmenten der humanen SphK1 sollten die Regionen der Aminosäuresequenz identifiziert werden, die für die SphK1-Translokation nach M_3 -Rezeptor-Stimulation notwendig sind. Von allen generierten SphK1-Fragmenten translozierte nur das SphK1-Fragment 3 nach Stimulation mit Carbachol vom Cytosol an die Plasmamembran. Dabei unterschied sich die Translokation dieses Fragments in der Kinetik nicht von der Translokation der humanen Wildtyp-SphK1. Dem die Aminosäuren 1-377 umfassenden SphK1-Fragment 3 fehlte lediglich die Bindungsstelle für das Adapter-Molekül TRAF2, welches für die Aktivierung der humanen SphK1 nach Stimulation mit TNF- α benötigt wird (Xia *et al.*, 2002). Wie zu erwarten, spielte also die TRAF2-Bindung keine Rolle bei der M_3 -Rezeptor-stimulierten SphK1-Translokation.

Die Aminosäuren zwischen Val³⁵⁰ und Met³⁷⁷ der humanen SphK1 scheinen essentiell für die durch Carbachol induzierte SphK1-Translokation zu sein, da die Lokalisation des im Vergleich zum Fragment 3 um 27 Aminosäuren kürzeren Fragments 2 (Aminosäuren 1-350) nicht durch Carbachol beeinflusst wurde. Diese 27 Aminosäuren umfassende, für die M_3 -Rezeptor-stimulierte Translokation essentielle Region der SphK1-Sequenz beinhaltet mit Ser³⁷¹ eine der mehreren möglichen PKC-Phosphorylierungsstellen, die ja, wie oben dargestellt, keine funktionelle Bedeutung für die M_3 -stimulierte SphK1-Translokation haben, und eine Lipidanlagerungsstelle (Aminosäuren 344-365), die vielleicht eine Rolle bei der durch Carbachol induzierten Translokation der humanen SphK1 spielen könnte. Auch der N-Terminus der SphK1 scheint wichtig für die durch Carbachol induzierte Translokation zu sein, da die N-terminal verkürzten SphK1-Fragmente 4-6 nicht translozierten. Dies zeigte, dass auch die N-terminalen Aminosäuren 1-110 für die durch Carbachol induzierte Translokation benötigt werden. Möglicherweise spielen die beiden Aminosäuren Thr⁵⁴ und

Arg⁸⁹ am N-Terminus der humanen SphK1-Sequenz eine essentielle Rolle bei der durch Carbachol induzierten Translokation. Diese beiden Aminosäuren interagieren über ihre Seitenketten mit membranständigem Phosphatidylserin, was essentiell für die durch TNF- α und PMA induzierte Translokation der SphK1 war (Stahelin *et al.*, 2005). Stahelin *et al.* (2005) zeigten, dass die SphK1-Mutanten SphK1^{T54A} und SphK1^{N89A} eine stark verminderte Membran-Affinität aufwiesen (Stahelin *et al.*, 2005). Eine Untersuchung an murinen SphK1-Fragmenten ergab, dass die cytosolische Lokalisation des N-terminalen Fragments der murinen SphK1 (Aminosäuren 1-169) durch die Stimulation mit Carbachol nicht beeinflusst wurde, während das C-terminale Fragment (Aminosäuren 134-388) schwach zur Plasmamembran translozierte. Die Translokation des C-terminalen Fragments stimmte mit den Daten von Delon *et al.* (2004) überein, die ebenfalls eine Translokation dieses murinen SphK1-Fragmentes beobachteten. Jedoch wurde diese SphK1-Translokation durch eine von der Phospholipase D (PLD) katalysierte Bildung von Phosphatidsäure (PA) an intrazellulären Membranen induziert (Delon *et al.*, 2004).

Tatsächlich stimuliert der M₃-Rezeptor in HEK-293-Zellen eine Aktivierung der PLD, die jedoch über G_{12/13}-Proteine verläuft (Rümenapp *et al.*, 2001). Auch hatte die Inhibierung der PLD mit 1-Butanol keinen Einfluss auf die M₃-stimulierte SphK1-Translokation (Meyer zu Heringdorf, persönliche Mitteilung). Schließlich hatte bereits Danneberg (2003) festgestellt, dass die durch Carbachol induzierte SphK1-Translokation nicht durch Genistein gehemmt wird, welches jedoch die PLD-Aktivierung durch den M₃-Rezeptor inhibiert (Schmidt *et al.*, 1994). Diese Untersuchungen legen nahe, dass die Aktivität der PLD und die Bildung von PA für die durch Carbachol induzierte Translokation keine Rolle spielen. Die PA-bindenden Domänen der SphK1 sind bisher noch nicht identifiziert worden, jedoch war der C-Terminus der murinen SphK1 essentiell für die Interaktion mit PA (Delon *et al.*, 2004).

Das C-terminale Fragment der murinen SphK1 nach Stimulation mit Carbachol translozierte, während die cytosolische Lokalisation des C-terminal um vier Aminosäuren längeren, humanen SphK1-Fragments 4 nicht durch Carbachol beeinflusst wurde. Dies und die Tatsache, dass eine Translokation des N-terminal längsten humanen SphK1-Fragments 5 (Aminosäuren 111-384) nicht durch Carbachol induziert werden konnte, belegt die These, dass die N-terminale Aminosäuresequenz vor der Aminosäure an Position 111 eine essentielle Rolle für die durch Stimulation G_q-gekoppelter Rezeptoren ausgelöste Translokation der humanen SphK1 spielt. Eventuell könnten kleine Sequenzunterschiede zwischen den Aminosäuren 134 und 388 der murinen SphK1 und den Aminosäuren 111 und 384 der

humanen SphK1 zur Bildung struktureller Motive beitragen, die für die beobachteten Unterschiede zwischen der humanen und der murinen SphK1 verantwortlich sein könnten. Möglich wäre z. B., dass die murine SphK1 weitere putative Phosphatidylserin-Bindungsstellen zwischen den Aminosäuren 134 und 388 besitzt, die die durch Carbachol induzierte Translokation des C-terminalen Fragments an die Plasmamembran vermitteln, und die in der humanen SphK1-Sequenz zwischen den Aminosäuren 111 und 384 nicht enthalten sind. Das SphK1-Fragment 6 war als einziges Fragment in etwa 90 % der beobachteten Zellen nicht nur cytosolisch, sondern auch im Kern lokalisiert. Diese Kernlokalisierung ist darauf zurückzuführen, dass in diesem Fragment die beiden Kernexport-Sequenzen fehlen, die zwischen den Aminosäuren 147 und 155 sowie zwischen den Aminosäuren 161 und 169 liegen und für die Relokalisation der SphK1 vom Kern zurück ins Cytosol verantwortlich sind (Inagaki *et al.*, 2003).

Schließlich wurde untersucht, ob es eine direkte Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und der SphK1 geben könnte. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, in mit YFP-SphK1 und konstitutiv aktivem $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE cotransfizierten HEK-293-Zellen mittels Coimmunopräzipitation eine wahrscheinlich direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachzuweisen. So wurde mit einem anti-YFP Antikörper nicht nur YFP-SphK1, sondern auch $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE gefällt. Umgekehrt ließ sich $G\alpha_q^{Q209L}$ -EE dagegen weder durch anti-EE noch durch anti- $G\alpha_q$ fällen, weshalb eine mögliche Copräzipitation der SphK1 nicht gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die SphK1 möglicherweise ein weiterer direkter Interaktionspartner von $G\alpha_q$ sein könnte, wobei für eine definitive Aussage noch zusätzliche Untersuchungen benötigt werden. In der Literatur wurden bisher, abgesehen von der PLC β , nur sehr wenige direkte $G\alpha_q$ -Effektoren beschrieben. Lutz *et al.* (2005) identifizierten den Guaninnukleotid-Austauschfaktor p63RhoGEF als direkten $G\alpha_{q/11}$ -Effektor, der G_q -gekoppelte Rezeptoren direkt mit Rho A und den Rho A-abhängigen zellulären Prozessen in HEK-293-Zellen verbindet. Inzwischen konnte der $G\alpha_q$ -p63RhoGEF-Komplex sogar kristallisiert werden (Lutz *et al.*, 2007).

5.2. Funktionelle Bedeutung der G_q -stimulierten Translokation der SphK1 an die Plasmamembran

Eine Kreuzaktivierung von S1P-Rezeptoren ist bisher hauptsächlich für Rezeptortyrosinkinasen und Antigen-Rezeptoren gezeigt worden (Toman *et al.*, 2004; Jolly *et al.*, 2004; Hobson *et al.*, 2001; El Shewy *et al.*, 2006). Hierbei sind sowohl eine sequenzielle

Aktivierung über Stimulation der SphK1 und Bildung von S1P, als auch sogenannte Signalplattformen, innerhalb derer die Rezeptoren direkt miteinander interagieren, beschrieben worden. So induzierte die Stimulation des TrkA-Rezeptors durch NGF in Spinalganglion-Neuronen eine Translokation der SphK1 an die Plasmamembran und führte über die lokale und zeitlich begrenzte Bildung von S1P zu einer Internalisierung der S1P-Rezeptoren S1P₁ und S1P₅. Hierdurch wurden Signalwege aktiviert, die die Ausdehnung von Neuriten regulieren. Eine katalytisch inaktive Mutante der SphK1 translozierte zwar nach Stimulation mit NGF an die Plasmamembran, reduzierte aber das Neuritenwachstum (Toman *et al.*, 2004). Eine andere Publikation beschreibt, dass die durch den IgE-Rezeptor induzierte Aktivierung und Translokation der SphK1 in Mastzellen einen Export von S1P bewirkte, welches dann den S1P₁- und S1P₂-Rezeptor aktivierte. Über die Kreuzaktivierung dieser S1P-Rezeptoren wurden die für allergische Reaktionen wichtige Migration und Degranulation der Mastzellen reguliert (Jolly *et al.*, 2004). In einem weiteren Beispiel führte die Stimulation von HEK-293-Zellen mit PDGF über die Aktivierung und Translokation der SphK1 zur Bildung und Ausschleusung von S1P, welches autokrin/parakrin über den S1P₁-Rezeptor die auf PDGF gerichtete Zellmigration steuerte (Hobson *et al.*, 2001). IGF stimuliert eine ERK-Aktivierung über SphK1-Translokation und Aktivierung sowie Internalisierung des S1P₁-Rezeptors, wobei dies durch den S1P₁/S1P₃-Rezeptor-Antagonisten VPC23019 inhibiert werden konnte (El Shewy *et al.*, 2006). In einer neueren Arbeit von Donati *et al.* (2007) wird gezeigt, dass die durch TNF- α induzierte Myogenese von einer S1P₂-Rezeptor-Kreuzaktivierung abhängig war (Donati *et al.*, 2007).

Ein Beispiel für die oben genannten Signalplattformen sind der PDGF-Rezeptor und der S1P₁-Rezeptor, welche nach separater Stimulation gemeinsam internalisieren, sich die G-Protein-Untereinheiten teilen und als funktionelle Einheit ERK1/2 regulieren sollen (Waters *et al.*, 2003). Grundlage dieses Modells ist die Tatsache, dass auch S1P₁-Mutanten mit einer defekten S1P-Bindungsstelle die durch den PDGF-Rezeptor vermittelten Signalwege verstärken (Waters *et al.*, 2006). In einem weiteren Modell sollen Rezeptortyrosinkinasen wie der IGF-1 Rezeptor den S1P₁-Rezeptor unabhängig von der SphK1 durch eine Akt-abhängige Phosphorylierung transaktivieren können (Lee *et al.*, 2001). In den Modellen der Signalplattform und der Aktivierung durch Phosphorylierung spielen SphK1 und S1P-Bildung keine Rolle, sondern es liegt eine Liganden-unabhängige Aktivierung des S1P₁-Rezeptors vor.

Hier konnte nun gezeigt werden, dass auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie der M₃-Rezeptor eine Kreuzaktivierung und Internalisierung von S1P-Rezeptoren bewirken können. So führte die Stimulation des M₃-Rezeptors mit Carbachol zu einer Internalisierung der in HEK-293-Zellen überexprimierten S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂ und S1P₃.

Mit Hilfe einer katalytisch inaktiven SphK1-Mutante, einer S1P₁-Rezeptormutante und eines kompetitiven S1P_{1/3}-Antagonisten konnte gezeigt werden, dass hier eine sequenzielle Aktivierung der S1P-Rezeptoren vorliegt. Erstens war die durch Carbachol induzierte S1P-Rezeptorinternalisierung abhängig von der katalytischen Aktivität der SphK1 und damit von der S1P-Bildung, da die katalytisch inaktive SphK1-Mutante SphK1^{G82D} zwar nach Carbachol-Stimulation zur Plasmamembran translozierte, jedoch die M₃-stimulierte Internalisierung des S1P₁-Rezeptors unterdrückte. Zweitens konnte weder durch exogenes S1P noch durch Carbachol eine Internalisierung der Rezeptormutante S1P₁^{R292A} ausgelöst werden, während die Kontrollmutante S1P₁^{K111A} effektiv internalisierte. S1P₁^{R292A} weist eine Mutation innerhalb der S1P-Bindungsstelle auf und kann S1P nicht binden (Parrill *et al.*, 2000). Drittens wurde die durch Carbachol stimulierte Internalisierung des S1P₁-Rezeptors, ebenso wie die durch S1P stimulierte Internalisierung, durch den kompetitiven S1P₁/S1P₃-Rezeptorantagonisten VPC23019 gehemmt. Dies Ergebnis zeigt, dass die beobachtete Rezeptorinternalisierung von einer Agonist-Bindung abhängig war und somit die Folge einer vorhergehenden Rezeptoraktivierung war.

Nicht nur die Stimulation des M₃-Rezeptors, sondern auch eine Überexpression von konstitutiv aktivem G α_q , welches eine SphK1-Translokation induziert (Danneberg, 2003), führte zur Internalisierung des S1P₁-Rezeptors. Auch in diesem Fall wurde die Rezeptormutante S1P₁^{R292A} nicht internalisiert. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Kreuzaktivierung von S1P-Rezeptoren auch durch andere G_q-gekoppelte Rezeptoren induziert werden könnte. Durch welchen Mechanismus das lokal gebildete S1P aus den Zellen exportiert wird, bleibt gegenwärtig unklar, jedoch könnten ATP-abhängige Transporter wie ABCC1 daran beteiligt sein (Mitra *et al.*, 2006) oder ein ATP-unabhängiges System, das durch Ca²⁺ stimuliert wird, wie es zumindest in Thrombozyten beschrieben wurde (Kobayashi *et al.*, 2006).

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung des G_q-gekoppelten M₃-Muskarinrezeptors über die Induktion der SphK1-Translokation an die Plasmamembran eine Internalisierung der S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂ und S1P₃ bewirkt. Für den S1P₁-Rezeptor konnte dabei gezeigt werden, dass die Internalisierung auf einer durch

5.3. Ca^{2+} -Homöostase in *SGPL1*^{-/-}-MEFs

Die zellulären S1P-Spiegel werden durch das Zusammenspiel von SphK und S1P-Lyase, S1P-Phosphatasen und verschiedenen Lipidphosphat-Phosphohydrolasen eng reguliert (Pyne und Pyne, 2000). Die S1P-Lyase ist mit einer transmembranären Domäne am ER verankert, wobei das katalytisch aktive Zentrum auf der dem Cytosol zugewandten Seite der ER-Membran liegt (Van Veldhoven und Mannaerts, 1991; Van Veldhoven, 2000; Van Veldhoven *et al.*, 2000). Dies lässt vermuten, dass die S1P-Lyase eher intrazelluläre als extrazelluläre S1P-Konzentrationen reguliert. Tatsächlich wurde erst kürzlich gezeigt, dass S1P-Lyase-defiziente Zellen ebenso wie Wildtyp-Zellen in der Lage sind, extrazelluläres S1P abzubauen (Peest *et al.*, 2008). Außerdem sind in *SGPL1*^{-/-}-MEFs die intrazellulären S1P-Spiegel deutlich erhöht (Van Veldhoven, 2005). Die S1P-Lyase beeinflusst durch ihre katalytische Aktivität das Gleichgewicht zwischen dem pro-apoptischen Ceramid und dem anti-apoptischen S1P und spielt dadurch eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellüberlebens. Eine Ausschaltung der S1P-Lyase durch siRNA und auch ihre Inhibierung durch THI hemmt über erhöhte S1P-Spiegel die Apoptose, während eine Überexpression des Enzyms die Apoptose induziert (Reiss *et al.*, 2004).

Da intrazelluläres S1P auch unabhängig von G-Protein gekoppelten S1P-Rezeptoren Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern mobilisieren kann (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998), wurde der Einfluss der erhöhten S1P-Spiegel auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase und die durch Agonisten ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in *SGPL1*^{-/-}-MEFs untersucht. Die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ betrug in den *SGPL1*^{-/-}-MEFs etwa 300 nM und war somit deutlich über physiologische Konzentrationen (ca. 100 nM) hinaus erhöht. Diese $[\text{Ca}^{2+}]_i$ liegt in einem Bereich, in dem das Zellwachstum gefördert wird, während eine noch höhere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über längere Zeit schließlich zum Zelltod führen kann (Berridge *et al.*, 2000). Interessanterweise war auch in S1P-Lyase-defizienten Hefen eine erhöhte basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen worden (Birchwood *et al.*, 2001). Es bestand jedoch ein wichtiger Unterschied zwischen der Hefe und den hier untersuchten *SGPL1*^{-/-}-MEFs. In der Hefe beruhte die erhöhte basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf einem von der S1P-Akkumulation abhängigen Ca^{2+} -Einstrom (Birchwood *et al.*, 2001), während in den *SGPL1*^{-/-}-MEFs die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auch in Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} signifikant erhöht war und folglich nicht auf einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom beruhte. Mögliche Ursachen der hohen basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in *SGPL1*^{-/-}-MEFs sind eine gesteigerte Ca^{2+} -Freisetzung, eine gestörte Wiederaufnahme in das ER, einer verminderte Ca^{2+} -Pufferung durch Mitochondrien oder ein gestörter Auswärtstransport über die Plasmamembran. Dennoch scheint intrazelluläres S1P

auch in Säugerzellen prinzipiell in der Lage zu sein, einen Ca^{2+} -Einstrom zu induzieren (Itagaki und Hauser, 2003).

In den *SGPLI*^{-/-}-MEFs waren außerdem die durch Agonisten induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege signifikant erhöht. Auch die durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege und deren Geschwindigkeit in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} waren in *SGPLI*^{-/-}-MEFs erhöht. Thapsigargin hemmt die SERCA-ATPase, welche Ca^{2+} gegen den Konzentrationsgradienten in die Ca^{2+} -Speicher pumpt. Die Zugabe von Thapsigargin zu den Zellen bewirkt einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, da das aus den Speichern ausströmende Ca^{2+} nicht wieder zurückgepumpt werden kann. Die Thapsigargin-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege spiegeln unter anderem also auch den Füllungsstatus der Ca^{2+} -Speicher wieder. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beobachteten erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege, induziert durch S1P, Bradykinin oder auch LPA, auf einer erhöhten Ca^{2+} -Speicherung in den Thapsigargin-sensitiven Speichern der *SGPLI*^{-/-}-MEFs zurückzuführen sind.

Durch die Vorinkubation der Zellen mit dem SphK-Inhibitor SKI II konnte die basal erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs signifikant vermindert werden. Folglich ist die basal erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und die durch verschiedene Agonisten erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs wahrscheinlich auf das durch die SphK gebildete und intrazellulär akkumulierende S1P zurückzuführen. So könnte der chronisch erhöhte S1P-Spiegel eine persistente Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern bewirken, ähnlich wie es für intrazellulär akut erhöhtes S1P bereits beschrieben worden ist (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998, 2003a), wodurch sich die basal erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs erklären lassen würde. Die ebenfalls erhöhte Ca^{2+} -Speicherung in den Thapsigargin-sensitiven Speichern der *SGPLI*^{-/-}-MEFs könnte möglicherweise auf einem Kompensationsmechanismus oder einer Art Gegenregulation beruhen, mit der die Zelle versucht, das basal erhöhte cytosolische Ca^{2+} mit Hilfe von Pumpen oder Austauschern aus dem Cytosol der Zellen in die intrazellulären Speicher zu schaffen.

Bei Untersuchungen an Einzelzellen fiel auf, dass die *SGPLI*^{-/-}-MEFs eine abnormale, deutlich verstärkte Fluo-4 Fluoreszenz in subzellulären Kompartimenten aufwiesen, während die Fluo-4 Fluoreszenz in *SGPLI*^{+/+}-MEFs homogen verteilt war. In diesem Zusammenhang ist es besonders wichtig, dass der bei den oben beschriebenen Untersuchungen verwendete Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzindikator Fura-2 unter den gewählten Bedingungen in beiden Zelltypen, also auch in *SGPLI*^{-/-}-MEFs, homogen verteilt war und so tatsächlich die cytosolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen wurde. Die abnormale Fluo-4 Fluoreszenz war nicht in allen

SGPLI^{-/-}-MEFs gleich verteilt, sondern es konnten zwei verschiedene Anfärbungsmuster beobachtet werden. Untersuchungen mit Organell-Markern zeigten, dass die Fluoreszenz meist entweder in Lysosomen oder im ER angereichert war, während nur in wenigen Zellen beide Organellen angefärbt waren. Diese Heterogenität innerhalb der Zellpopulation könnte darauf beruhen, dass MEFs aus einem Gemisch verschiedener mehr oder weniger differenzierter Zellen, die möglicherweise aus verschiedenen Keimblättern stammen, hochgezogen werden. Eine Stimulation mit Thapsigargin verminderte die abnormale netzartige und punktuelle Fluo-4 Fluoreszenz, während die cytosolische Fluoreszenz anstieg, was zeigt, dass Thapsigargin-sensitive Ca²⁺-Speicher angefärbt wurden. Die lokal erhöhte Fluo-4 Fluoreszenz in *SGPLI*^{-/-}-MEFs beruhte sehr wahrscheinlich nicht auf dem oben beschriebenen erhöhten Ca²⁺-Gehalt der intrazellulären Speicher. Da die Dissoziationskonstante von Fluo-4 für Ca²⁺ 345 nM beträgt, wird das Fluo-4 in den intrazellulären Ca²⁺-Speichern aufgrund der im mikromolaren Bereich befindlichen Ca²⁺-Konzentrationen in diesen Speichern (Berridge *et al.*, 2000) maximal mit Ca²⁺ abgesättigt. [Ca²⁺]-Unterschiede sind in diesem Konzentrationsbereich also nicht mehr mit Fluo-4 detektierbar. Deshalb ist anzunehmen, dass sich Fluo-4 im ER und in den Lysosomen der *SGPLI*^{-/-}-MEFs anreichert.

Einen möglichen Hinweis auf die Ursache hierfür könnte die Tatsache liefern, dass das chemisch dem Fluo-4 verwandte Fluo-3 ein Substrat von Transportern aus der ABC-Transporterfamilie ist (Honig *et al.*, 2003). Die ABC-Transporter werden insbesondere in Tumorzellen hoch exprimiert, lassen sich jedoch auch in nicht transformierten Zellen nachweisen. Sie vermitteln einen ATP-abhängigen Export verschiedener Substanzen über die Plasmamembran und regulieren so beispielsweise die Arzneimittelresorption im Darm, den Transport über die Blut-Hirn-Schranke und die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika (Kartner *et al.*, 1983; Cole *et al.*, 1992; Doyle *et al.*, 1998; Maliepaard *et al.*, 2001). Interessanterweise können ABC-Transporter auch an intrazellulären Membranen lokalisiert sein (Shapiro *et al.*, 1998; Van Luyn *et al.*, 1998; Meschini *et al.*, 2000). MRP1 ist in vielen normalen Geweben vorrangig intrazellulär lokalisiert (Wioland *et al.*, 2000). Rajgopal und Simon (2003) zeigten, dass *P-glycoprotein* (Pgp), *multidrug resistance protein-1* (MRP1) und *breast cancer resistance protein* (BCRP) auch an lysosomalen Membranen lokalisiert sind und zur Entwicklung von Medikamentenresistenzen beitragen können, indem sie Substanzen vom Cytosol in die Lysosomen hinein transportieren und so beispielsweise einem Wirkort im Kern entziehen. Die abnormale Fluo-4 Anreicherung in den Lysosomen der

SGPLI^{-/-}-MEFs könnte also auf einer vermehrten Expression von ABC-Transportern in den Membranen von Lysosomen oder ER basieren, welche vielleicht durch die intrazellulär erhöhten S1P-Spiegel induziert werden könnte. Tatsächlich ist in vielen Tumorzellen die SphK1 hoch exprimiert, was zur Chemoresistenz dieser Zellen beiträgt (French *et al.*, 2003; Kawamori *et al.*, 2006), während die S1P-Lyase herunterreguliert ist (Oskouian *et al.*, 2006).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass in *SGPLI*^{-/-}-MEFs eine erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ sowie eine gesteigerte Ca^{2+} -Speicherung in Thapsigargin-sensitiven Speichern zu finden ist, was zur Verstärkung der durch Agonisten induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege führt.

5.4. Zelluläre Wirkungen des Sphingosin-Analogons cis-4-MSph

Mit cis-4-MSph stand ein synthetisches Sphingosin-Analogon zur Verfügung, das sich nach Phosphorylierung, im Gegensatz zum kurzlebigen S1P, intrazellulär anreichert und dessen Wirkungen imitiert (van Echten-Deckert *et al.*, 1998; Naetzker *et al.*, 2006). Die akute Stimulation von HEK-293-Zellen mit cis-4-MSph induzierte rasche und transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von van Echten-Deckert *et al.* (1998) in Swiss 3T3-Fibroblasten überein. Die durch cis-4-MSph induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege verliefen langsamer als die durch S1P und unterschieden sich also in der Kinetik von durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen. Andererseits verliefen sie signifikant schneller als die durch Sphingosin induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege. Die Vorinkubation mit cis-4-MSph führte zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Hemmung der durch S1P induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege. Die basale $[Ca^{2+}]_i$ wurde nicht beeinflusst, folglich verhielt sich das intrazellulär akkumulierende cis-4-MS1P anders als das bei einer S1P-Lyase-Defizienz intrazellulär akkumulierende S1P. Auch die durch andere Agonisten ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden nicht beeinflusst, was eine spezifische Interaktion von cis-4-MSph oder cis-4-MS1P mit S1P-Rezeptoren nahelegte.

Der Verlauf der S1P-Konzentrations-Wirkungskurven jeweils nach fünfminütiger oder mehrstündiger Vorinkubation mit cis-4-MSph deutete darauf hin, dass die Inhibierung der durch S1P ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege nicht auf einem kompetitiven Antagonismus von cis-4-MSph an S1P-Rezeptoren beruhte, da sich die Hemmwirkung von cis-4-MSph mit der Zeit verstärkte. In früheren Arbeiten war durch den Einsatz des SphK-Inhibitors *L-threo*-Sphingamin gezeigt worden, dass eine Phosphorylierung von cis-4-MSph zu cis-4-MS1P für die biologische Wirkung benötigt wurde (van Echten-Deckert *et al.*, 1997; 1998). Hier konnte nun mit Hilfe von SphK1-defizienten MEFs erstmals belegt werden, dass die Wirkung von

cis-4-MSph wesentlich von der Phosphorylierung durch die SphK1 abhängig war. So war die durch cis-4-MSph verursachte Hemmung der S1P-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in SphK1-defizienten MEFs sehr viel geringer ausgeprägt als in den entsprechenden Kontroll-MEFs. Die verbliebene Hemmwirkung von cis-4-MSph in SphK1-defizienten MEFs könnte auf einer Phosphorylierung durch SphK2 beruhen.

Es lag nahe, zu vermuten, dass die Hemmung der S1P-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch cis-4-MSph auf einer Desensibilisierung von S1P-Rezeptoren beruhte, wie es auch für das Sphingosin-Analogen FTY720 gezeigt worden war (Bilich *et al.*, 2003). HEK-293-Zellen exprimieren endogen die S1P-Rezeptoren S1P₁₋₃ (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2001), wobei S1P₂ und S1P₃ an der Vermittlung von $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen beteiligt sind (Lichte *et al.*, 2008). In MEFs dagegen sind S1P-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wahrscheinlich nahezu komplett auf die Aktivität des S1P₃-Rezeptors zurückzuführen, da eine Deletion des S1P₂-Rezeptors keinen großen Einfluss auf die durch S1P ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege hatte (Ishi *et al.*, 2002). Der S1P₁-Rezeptor wiederum inhibiert über den PKC-Signalweg Rezeptor-vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in verschiedenen Zelllinien, ohne selbst $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege zu induzieren (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003b).

In Übereinstimmung hiermit wurden durch die Langzeitinkubation mit cis-4-MSph sowohl der S1P₂- als auch der S1P₃-Rezeptor in HEK-293-Zellen deutlich von der Plasmamembran in den perinukleären Raum der Zellen internalisiert. Der S1P₁-Rezeptor wurde im Vergleich zum S1P₂- und S1P₃-Rezeptor durch die Inkubation mit cis-4-MSph in einem deutlich geringeren Maße internalisiert und war größtenteils weiterhin membranständig. Hieraus lässt sich schließen, dass cis-4-MSph in HEK-293-Zellen zu cis-4-MS1P phosphoryliert wird, welches dann S1P-Rezeptoren internalisiert und zwar hauptsächlich die an $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege koppelnden S1P₂- und S1P₃-Rezeptoren, was dann zur beobachteten Hemmung von S1P-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen führt. Dies erklärt auch die Zunahme der Hemmwirkung bei längeren Inkubationszeiten. Die durch cis-4-MSph induzierten akuten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege legen wiederum nahe, dass cis-4-MS1P exportiert wird und zunächst als Agonist auf S1P₂ und S1P₃ wirkt, was dann zu einer anschließenden Internalisierung führt. Hierzu passt, dass cis-4-MS1P die Zelltyp-spezifischen Wirkungen von S1P imitiert, wie Proliferation, DNA-Synthese oder auch Apoptose (van Echten-Deckert *et al.*, 1997; 1998). Durch weitere Versuche müsste bestätigt werden, dass die durch cis-4-MSph ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege auf einer Aktivierung von S1P-Rezeptoren beruhen. So müssten sie sich durch Antagonisten wie VPC23019 oder BML-241 oder eine S1P-Vorbehandlung

hemmen lassen. Der langsamere Ablauf der durch Sphingosin induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege ließe sich dann dadurch erklären, dass das gebildete S1P im Gegensatz zum metabolisch stabilen cis-4-MS1P rasch abgebaut wird.

Die beiden Sphingosin-Analoga cis-4-MSpH und FTY720 sind sich in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich. So werden beide Substanzen nach der Zugabe in die Zellen aufgenommen, intrazellulär durch die SphK zu den jeweils wirksamen Metaboliten cis-4-MS1P bzw. FTY720-P phosphoryliert, die beide in spezifischer Weise S1P-Rezeptoren aktivieren, internalisieren und desensibilisieren können. Es gibt jedoch einige Unterschiede zwischen den beiden Substanzen. So spielte die SphK1 eine wesentliche Rolle für die Wirkung von cis-4-MSpH, während FTY720 überwiegend durch die SphK2 phosphoryliert wird, von der auch seine immunsuppressive Wirkung abhängig ist (Kharel *et al.*, 2005). Außerdem unterscheiden sich beide Substanzen in ihrem Rezeptorprofil. FTY720-P aktiviert alle S1P-Rezeptorsubtypen mit Ausnahme des S1P₂-Rezeptors (Brinkmann *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Vorinkubation mit FTY720 im Gegensatz zu cis-4-MSpH keine Hemmung der durch S1P vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege, was sich dadurch erklären lässt, dass der S1P₂-Rezeptor zu einem großen Teil für die durch S1P ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in HEK-293-Zellen verantwortlich ist. Die Inkubation mit FTY720 führt vor allem zu einer lang anhaltenden Internalisierung des S1P₁-Rezeptors, wodurch es zu einer Retention der Lymphozyten in den Lymphknoten kommt (Matloubian *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu internalisierte cis-4-MSpH den S1P₁-Rezeptor in einem deutlich geringeren Maße als FTY720. Eine weitere Gemeinsamkeit dieser beiden Sphingosin-Analoga besteht darin, dass sie nicht durch die S1P-Lyase, sondern nur durch die von Phosphatasen katalysierte Dephosphorylierung abgebaut werden können (Bandhuvula *et al.*, 2005; van Echten-Deckert *et al.*, 1997; 1998).

Wie das FTY720-P imitiert cis-4-MS1P die Zelltyp-spezifischen Wirkungen von S1P (van Echten-Deckert *et al.*, 1997; 1998). Diese Tatsache könnte das cis-4-MSpH auch interessant für eine therapeutische Anwendung machen. Dabei würden sich wahrscheinlich aufgrund des unterschiedlichen Rezeptorprofils zum FTY720 verschiedene Wirkungen ergeben. Als unerwünschte Wirkung des FTY720 bzw. FTY720-P treten transiente Bradykardien auf, die vermutlich durch die Aktivierung des S1P₃-Rezeptors vermittelt werden (Sanna *et al.*, 2004). Da cis-4-MSpH bzw. dessen Phosphat auch auf den S1P₃-Rezeptor wirkt, könnte es möglicherweise ebenfalls Bradykardien auslösen. Im Gegensatz zum FTY720 würde das cis-4-MSpH aufgrund seiner schwachen Interaktion mit dem S1P₁-Rezeptor wahrscheinlich keine

Lymphozytopenie auslösen und damit nicht als Immunsuppressivum in Frage kommen. Ein wichtiger Unterschied des cis-4-MSph zum FTY720 stellt die Tatsache dar, dass es den S1P₂-Rezeptor stark internalisiert, während das FTY720 keinen Einfluss auf diesen S1P-Rezeptor hat. Der S1P₂-Rezeptor inhibiert über G_{12/13}-Proteine die Aktivierung von Rac und führt so zur Hemmung der Zellmigration. So könnte cis-4-MSph vielleicht durch seine Wirkung auf den S1P₂-Rezeptor die Chemotaxis und Migration einer Vielzahl von Zellen beeinflussen. Dabei müsste untersucht werden, ob die Hauptwirkung von cis-4-MSph durch eine akute Aktivierung des Rezeptors oder durch die langfristige Internalisierung und damit Ausschaltung des Rezeptors bestimmt wird.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Steuerung der lokalisierten S1P-Bildung und ihre Konsequenzen anhand der G_q -vermittelten SphK-Translokation, an S1P-Lyase-defizienten Zellen sowie mit Hilfe des Sphingosin-Analogons cis-4-MSph untersucht werden. Im ersten Teil wurde der molekulare Mechanismus der durch den M_3 -Rezeptor stimulierten SphK1-Translokation näher charakterisiert und dessen funktionelle Bedeutung untersucht. Wie zuvor für die murine SphK1 gezeigt, translozierte auch die humane SphK1 nach Stimulation des M_3 -Rezeptors rasch und lang anhaltend an die Plasmamembran. Die Halbwertszeit der Translokation betrug ca. 3-4 s. Die phosphorylierungsdefiziente Mutante SphK1^{S225A} translozierte mit der gleichen Halbwertszeit. Folglich ist die durch eine ERK-ähnliche Kinase katalysierte Phosphorylierung des Ser²²⁵ der humanen SphK1 nicht essentiell für die Translokation durch den M_3 -Rezeptor, welche somit einen anderen Mechanismus als die durch TNF- α oder Phorbol ester (PMA) induzierte SphK1-Translokation aufweist.

Die SphK1 translozierte langsamer als die PKC- α , jedoch schneller als die PKD. Die Translokation der PKC- α war, wie vorher beschrieben, reversibel und ließ sich durch Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_i$ restimulieren, was jedoch keinen Einfluss auf die SphK1-Translokation und -Lokalisation hatte. Eine Translokation der PKD ließ sich, außer mit dem M_3 -Rezeptor-Agonisten Carbachol, auch mit PMA stimulieren. Im Gegensatz dazu induzierte PMA höchstens gering ausgeprägte Translokationen der humanen SphK1, die sich damit nicht von der murinen SphK1 unterschied. Interessanterweise stimulierte sogar die Kombination von Ionomycin (Induktion von $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen) und PMA (Stimulation der PKC) höchstens gering ausgeprägte SphK1-Translokationen, und Carbachol war auch nach dieser Behandlung noch wirksam. Diese Beobachtung ergänzt zuvor durchgeführte Untersuchungen, die eine Rolle von klassischen G_q -vermittelten Signalwegen bei der M_3 -Rezeptor-stimulierten SphK1-Translokation ausgeschlossen hatten.

Schließlich wurde durch Coimmunopräzipitationsstudien zum ersten Mal eine wahrscheinlich direkte Interaktion von $G\alpha_q$ und SphK1 nachgewiesen. Durch Untersuchungen an SphK1-Fragmenten konnte gezeigt werden, dass der Bereich zwischen den Aminosäuren Val³⁵⁰ und Met³⁷⁷ sowie die N-terminalen Aminosäuren vor Position 110 der humanen SphK1 essentiell für die M_3 -stimulierte SphK1-Translokation sind. Bei den Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der SphK1-Translokation wurde festgestellt, dass die Stimulation

des M₃-Rezeptors mit Carbachol zu einer Internalisierung der in HEK-293-Zellen überexprimierten S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂ und S1P₃ führte. Dabei konnte mit Hilfe der katalytisch inaktiven SphK1-Mutante SphK1^{G82D}, der S1P₁-Rezeptormutante S1P₁^{R292A} und des S1P_{1/3}-Antagonisten VPC23019 gezeigt werden, dass hierfür die katalytische Aktivität der SphK1 sowie die Bindung von S1P an den S1P₁-Rezeptor benötigt wird. Auch die Expression von konstitutiv aktivem G_{αq}, welche eine SphK1-Translokation bewirkt, führte zur Internalisierung des S1P₁-Rezeptors. So konnte gezeigt werden, dass G_q-gekoppelte Rezeptoren über die autokrine/parakrine Aktivierung von S1P-Rezeptoren vermutlich G_i- und G_{12/13}-Signalwege aktivieren können.

Im nächsten Teil der Arbeit wurde die Ca²⁺-Homöostase in *SGPLI*^{-/-}-MEFs untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl die basale [Ca²⁺]_i als auch die durch Agonisten induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege in diesen Zellen, im Vergleich zu *SGPLI*^{+/+}-MEFs, signifikant erhöht waren. Die durch Thapsigargin induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege waren signifikant höher und verliefen schneller. Die Ca²⁺-Speicherung war also gesteigert, was auch die Verstärkung der durch Agonisten induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege erklärt. Auch in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ waren sowohl die basale [Ca²⁺]_i als auch die durch Thapsigargin induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege erhöht. Diese Wirkungen kamen also nicht durch einen verstärkten Ca²⁺-Einstrom zustande. Durch Hemmung der SphK mit SKI II wurde die erhöhte basale [Ca²⁺]_i deutlich reduziert, was nahelegt, dass die Ursache der veränderten Ca²⁺-Homöostase der erhöhte S1P-Spiegel in den *SGPLI*^{-/-}-MEFs sein könnte. Die außerdem beobachtete abnormale Speicherung des Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4 in Lysosomen und ER der *SGPLI*^{-/-}-MEFs lässt sich gegenwärtig nicht erklären.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die zellulären Wirkungen des Sphingosin-Analogs cis-4-MSph untersucht. Es war bekannt, dass cis-4-MSph zum metabolisch stabilen cis-4-MS1P phosphoryliert wird, welches sich im Gegensatz zum kurzlebigen S1P intrazellulär anreichert (van Echten-Deckert *et al.*, 1997; 1998). Die akute Stimulation mit cis-4-MSph induzierte transiente [Ca²⁺]_i-Anstiege, welche langsamer als die durch S1P, aber schneller als die durch Sphingosin verliefen. Eine Vorinkubation mit cis-4-MSph hatten keinen Einfluss auf die basale [Ca²⁺]_i, führte jedoch zu einer spezifischen Hemmung der [Ca²⁺]_i-Anstiege durch S1P. Die Hemmung der S1P-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege war nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Inkubationszeit abhängig und bei mehrstündigen Inkubationen sehr viel stärker ausgeprägt als nach 5 min, was gegen einen kompetitiven Antagonismus von cis-4-MSph an S1P-Rezeptoren spricht. Außerdem war die Hemmwirkung

in *SPHK1*^{-/-}-MEFs deutlich abgeschwächt und folglich von der cis-4-MS1P-Bildung abhängig. Schließlich wurde festgestellt, dass die Langzeitinkubation mit cis-4-MSph eine Internalisierung von S1P-Rezeptoren induzierte, insbesondere der an $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege koppelnden S1P₂- und S1P₃-Rezeptoren. Daraus lässt sich schließen, dass die Hemmung der S1P-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch cis-4-MSph auf einer durch cis-4-MS1P induzierten Internalisierung von S1P-Rezeptoren beruht. Damit hat cis-4-MSph eine ähnliche Wirkung wie das Sphingosin-Analogon FTY720, welches nach Phosphorylierung S1P-Rezeptoren aktiviert und internalisiert, wobei sich jedoch die Rezeptor-Profile der beiden Substanzen unterscheiden.

7. Literatur

- Alderton, F., Rakhit, S., Kong, K. C., Palmer, T., Sambhi, B., Pyne, S., Pyne, N. J. (2001).** Tethering of the platelet-derived growth factor beta receptor to G-protein- coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 28578-28585.
- Aleman, R., Meyer zu Heringdorf, D., van Koppen, C. J., Jakobs, K. H. (1999).** Formyl peptide receptor signaling in HL-60 cells through sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 3994-3999.
- Aleman, R., Kleuser, B., Ruwisch, L., Danneberg, K., Lass, H., Hashemi, R., Spiegel, S., Jakobs, K. H., Meyer zu Heringdorf, D. (2001).** Depolarisation induces rapid and transient formation of intracellular sphingosine-1-phosphate. *FEBS Lett.* **509**, 239-244.
- Aleman, R., van Koppen, C., Danneberg, K., ter Braak, Meyer zu Heringdorf, D. (2007).** Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **374**, 413-428.
- Allende, M. L., Yamashita, T., Proia, R. L. (2003).** G-protein-coupled receptor S1P₁ acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* **102**, 3665-3667.
- An, S., Bleu, T., Zheng, Y. (1999).** Transduction of intracellular calcium signals through G protein-mediated activation of phospholipase C by recombinant sphingosine 1- phosphate receptors. *Mol. Pharmacol.* **55**, 787-794.
- Bandhuvula, P., Tam, Y. Y., Oskouian, B., Saba, J. D. (2005).** The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 33697-33700.
- Bektas, M., Jolly P. S., Muller, C., Eberle, J., Spiegel, S., Geilen, C. C. (2005).** Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* **24**, 178-187.
- Berridge, M. J., Lipp, P., Bootman, M. D. (2000).** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 11-21.
- Billich, A., Bornancin, F., Dévay, P., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., Baumruker, T. (2003).** Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J. Biol. Chem.* **278**, 47408-47415.
- Birchwood, C. J., Saba, J. D., Dickson, R. C., Cunningham, K. W. (2001).** Calcium influx and signaling in yeast stimulated by intracellular sphingosine 1-phosphate accumulation. *J. Biol. Chem.* **276**, 11712-11718.

- Brinkmann, V., Davis, M. D., Heise, C. E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., Foster, C. A., Zollinger, M., Lynch, K. R. (2002).** The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 21453-21457.
- Brinkmann, V., Cyster, J. G., Hla, T. (2004).** FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am. J. Transplant.* **4**, 1019-1025.
- Buehrer, B. M., Bardes, E. S., Bell, R. M. (1996).** Protein kinase C-dependent regulation of human erythroleukemia (HEL) cell sphingosine kinase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1303**, 233-242.
- Carmena, D., Sardini, A. (2007).** Lifespan regulation of conventional protein kinase C isoforms. *Biochem Soc Trans.* **35**, 1043-1045.
- Chin, T.-Y., Hwang, H.-M., Chueh, S.-H. (2002).** Distinct effects of different calcium-mobilizing agents on cell death in NG108-15 neuroblastoma X glioma cells. *Mol. Pharmacol.* **61**, 486-494.
- Choi, O. H., Kim, J.-H., Kinet, J.-P. (1996).** Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the Fc γ RI antigen receptor. *Nature* **380**, 634-636.
- Chun, J., Goetzl, E. J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K. R., Moolenaar, W., Pyne, S., Tigyi, G. (2002).** International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **54**, 265-269.
- Clair, T., Aoki, J., Koh, E., Bandle, R. W., Nam, S. W., Ptaszynska, M. M., Mills, G. B., Schiffmann, E., Liotta, L. A., Stracke, M. L. (2003).** Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res.* **63**, 5446-5453.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., Deeley, R. G. (1992).** Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-1654.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Spiegel, S. (1996).** Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**, 800-803.
- Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., Spiegel, S. (1998).** Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **30**, 2910-2916.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., Ahn, S., Della Rocca, G. J., Ferguson, S. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1998).** Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 685-688.

- Danneberg, K., (2003).** Funktionelle Rolle und subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen 1 und 2 in HEK-293- und PC12-Zellen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. des Fachbereiches Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur an der Universität Duisburg-Essen aus dem Institut für Pharmakologie
- Davis, M. D., Clemens, J. J., Macdonald, T. L., Lynch, K. R. (2005).** Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. *J. Biol. Chem.* **280**, 9833-9841.
- DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Déry, O., Mullins, R. D., Bunnett, N. W. (2000).** beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell. Biol.* **148**, 1267-1281.
- Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Thompson, D., Krugmann, S., Pyne, S., Ktistakis, N. T., (2004).** Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **279**, 44763-44774.
- Donati, C., Nincheri, P., Cencetti, F., Rapizzi, E., Farnararo, M., Bruni, P. (2007).** Tumor necrosis factor-alpha exerts pro-myogenic action in C2C12 myoblasts via sphingosine kinase/S1P2 signaling. *FEBS Lett.* **581**, 4384-4388.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., Ross, D. D. (1998).** A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 15665-15670.
- El-Shewy, H. M., Johnson, K. R., Lee, M. H., Jaffa, A. A., Obeid, L. M., Luttrell, L. M. (2006).** Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* **281**, 31399-31407.
- English, D., Kovala, A. T., Welch, Z., Harvey, K. A., Siddiqui, R. A., Brindle Carcia, J. G. (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**, 627-634.
- French, K. J., Schrecengost, R. S., Lee, B. D., Zhuang, Y., Smith, S. N., Eberly, J. L., Yun, J. K., Smith, C. D. (2003).** Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res.* **63**, 5962-5969.
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. J. A., Weiner, J. A., Chun, J. (2001).** Lysophospholipid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 507-534.
- Ghosh, T. K., Bian, J., Gill, D. L. (1994).** Sphingosine-1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J. Biol. Chem.* **269**, 22628-22635.
- Goetzl, E. J., An, S. (1998).** Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.* **12**, 1589-1598.

- Goetzl, E. J., Wang, W., McGiffert, C., Huang, M. C., Graler, M. H. (2004).** Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J. Cell. Biochem.* **92**, 1104-1114.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1990).** Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425-430.
- Goparaju, S. K., Jolly, P. S., Watterson, K. R., Bektas, M., Alvarez, S., Sarkar, S., Mel, L., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S., Spiegel, S. (2005).** The S1P₂ receptor negatively regulates platelet-derived growth factor-induced motility and proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4237-4249.
- Graeler, M. H., Bernhardt, G., Lipp, M. (1998).** EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* **53**, 164-169.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985).** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.
- Hait, N. C., Sarkar, S., Le Stunff, H., Mikami, A., Maceyka, M., Milstien, S., Spiegel, S. (2005).** Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **280**, 29462-29469.
- Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S., Spiegel, S. (2006).** Sphingosine kinases, sphingosin 1-phosphate, apoptosis and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 2016-2026.
- Hait, N. C., Bellamy, A., Milstien, S., Kordula, T., Spiegel, S. (2007).** Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 12058-12065.
- Hänel, P., Andréani, P., Gräler, M. H. (2007).** Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* **21**, 1202-1209.
- Herr, D. R., Fyrst, H., Phan, V., Heinecke, K., Georges, R., Harris, G. L., Saba, J.D. (2003).** Sply regulation of sphingolipid signaling molecules is essential for Drosophila development. *Development* **130**, 2443-2453.
- Himmel, H. M., Meyer zu Heringdorf, D., Graf, E., Dobrev, D., Kortner, A., Schüler, S., Jakobs, K. H., Ravens, U. (2000).** Evidence for Edg-3 receptor-mediated activation of I_{K,ACh} by sphingosine-1-phosphate in human atrial cardiomyocytes. *Mol. Pharmacol.* **58**, 449-454.
- Hla, T., Maciag, T. (1990).** An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-proteincoupled receptors. *J. Biol. Chem.* **265**, 9308-9313.
- Hla, T. (2003).** Signalling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacological Res.* **47**, 401-407.

- Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Barak, L. S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M. G., Milstien, S., Spiegel, S. (2001).** Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*, **291**, 1800-1803.
- Honig, S. M., Fu, S., Mao, X., Yopp, A., Gunn, M. D., Randolph, G. J., Bromberg, J. S. (2003).** FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. *J. Clin. Invest.* **111**, 627-637.
- Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., Nakamura, S. (2003).** Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *Biochem. Mol. Biol.* **278**, 46832-46839.
- Inagaki, Y., Li, P. Y., Wada, A., Mitsutake, S., Igarashi, Y. (2003).** Identification of functional nuclear export sequences in human sphingosine kinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 168-173.
- Ishii, I., Ye, X., Friedman, B., Kawamura, S., Contos, J. J., Kingsbury, M. A., Yang, A. H., Zhang, G., Brown, J. H., Chun, J. (2002).** Marked perinatal lethality and cellular signalling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P₂/LP_{B2}/EDG-5 and S1P₃/LP_{B2}/EDG-3. *J. Biol. Chem.* **277**, 25152-25159.
- Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., Chun, J. (2004).** Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 321-354.
- Itagaki, K., Hauser, C. J. (2003).** Sphingosine 1-phosphate, a diffusible calcium influx factor mediating store-operated calcium entry. *J. Biol. Chem.* **278**, 27540-27547.
- Jolly, P. S., Bektas, M., Olivera, A., Gonzalez-Espinosa, C., Proia, R. L., Rivera, J., Milstien, S., 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**, 959-970.
- Jolly, P. S., Bektas, M., Watterson, K. R., Sankala, H., Payne, S. G., Milstien, S., Spiegel, S. (2005).** Expression of SphK1 impairs degranulation and motility of RBL-2H3 mast cells by desensitizing S1P receptors. *Blood* **105**, 4736-4742.
- Johnson, K. R., Becker, K. P., Facchinetti, M. M., Hannun, Y. A., Obeid, L. M. (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**, 35257-35262.
- Kharel, Y., Lee, S., Snyder, A. H., Sheasley-O'Neill, S. L., Morris, M. A., Setiady, Y., Zhu, R., Zigler, M. A., Burcin, T. L., Ley, K., Tung, K. S., Engelhard, V. H., Macdonald, T. L., Pearson-White, S., Lynch, K. R. (2005).** Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. *J. Biol. Chem.* **280**, 36865-36872.
- Kappos, L., Antel, J., Comi, G., Montalban, X., O'Connor, P., Polman, C. H., Haas, T., Korn, A. A., Karlsson, G., Radue, E. W.; FTY720 D2201 Study Group. (2006).** Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1124-1140.

- Kartner, N., Riordan, J. R., Ling, V. (1983).** Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* **221**, 1285-1288.
- Kawamori, T., Osta, W., Johnson, K. R., Pettus, B. J., Bielawski, J., Tanaka, T., Wargovich, M. J., Reddy, B. S., Hannun, Y. A., Obeid, L. M., Zhou, D. (2006).** Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *FASEB J.* **20**, 386-388.
- Kihara, A., Ikeda, M., Kariya, Y., Lee, E. Y., Lee, Y. M., Igarashi, Y. (2003).** Sphingosine-1-phosphate lyase is involved in the differentiation of F9 embryonal carcinoma cells to primitive endoderm. *J. Biol. Chem.* **278**, 14578-14585.
- Kihara, A., Anada, Y., Igarashi, Y. (2006).** Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J. Biol. Chem.* **281**, 4532-4539.
- Kleuser, B., Cuvillier, O., Spiegel, S. (1998).** 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits programmed cell in HL-60 cells by activation of sphingosine kinase. *Cancer Res.* **58**, 1817-1824.
- Kluk, M. J., Hla, T. (2001).** Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ. Res.* **89**, 496-502.
- Kobayashi, N., Nishi, T., Hirata, T., Kihara, A., Sano, T., Igarashi, Y., Yamaguchi, A. (2006).** Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J. Lipid Res.* **47**, 614-621.
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S. (1998).** Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 23722-23728.
- Kono, M., Belyantseva, I. A., Skoura, A., Frolenkov, G. I., Starost, M. F., Dreier J. L., Lidington, D., Bolz, S. S., Friedman, T. B., Hla, T., Proia, R. L. (2007).** Deafness and stria vascularis defects in S1P₂ receptor null mice. *J. Biol. Chem.* **282**, 10690-10696.
- Krupnick, J. G., Benovic, J. L. (1998).** The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 289-319.
- Kupperman, E., An, S., Osborne, N., Waldron, S., Stainier, D. Y. R. (2000).** A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* **406**, 192-195.
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., Barak, L. S. (1999).** The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 3712-3717.
- Lee, M.-J., Evans, M., Hla, T. (1996).** The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G_i/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 11272-11279.

- Lee, M.-J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S., Hla, T. (1998). Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* **279**, 1552-1555.
- Lee, M.-J., Thangada, S., Claffey, K. P., Ancellin, N., Liu, C. H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R. I., Hla, T. (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*. **99**, 301-312.
- Lee, M. J., Thangada, S., Paik, J. H., Sapkota, G. P., Ancellin, N., Chae, S. S., Wu, M., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C., Alessi, D. R., Hla, T. (2001). Akt-mediated phosphorylation of the G-protein-coupled receptor Edg-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell*. **8**, 693-704.
- Le Stunff, H. L., Milstien, S., Spiegel, S. (2004). Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *J. Cell. Biochem.* **92**, 882-899.
- Sutherland, C. M., Moretti, P. A., Hewitt, N. M., Bagley, C. J., Vadas, M. A., Pitson, S. M. (2006). The calmodulin-binding site of sphingosine kinase and its role in agonist-dependent translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **281**, 1693-1701.
- Li, Y., Alexander, H., Schneider, N., Alexander, S. (2000). Molecular basis für resistance to the anticancer drug cisplatin in *Dyctiostelium*. *Microbiology* **146**, 2219-2227.
- Lichte, K., Rossi, R., Danneberg, K., ter Braak, M., Kürschner, U., Jakobs, K. H., Kleuser, B., Meyer zu Heringdorf, D. (2008). Lysophospholipid receptor-mediated Calcium Signaling in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* (im Druck, doi: 10.1038/sj.jid.5701207)
- Liu, C. H., Thangada, S., Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Spiegel, S., Hla, T. (1999). Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 1179-1190.
- Liu, H., Sugiura, M., Nava, V. E., Edsall, L. C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., Spiegel, S. (2000). Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J. Biol. Chem.* **275**, 19513-19520.
- Liu, H., Toman, R. E., Goparaju, S. K., Maceyka, M., Nava, V. E., Sankala, H., Payne, S. G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S., Spiegel, S. (2003). Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 40330-40336.
- Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661.
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rümenapp, U., Jakobs, KH., Schmidt, M., Wieland, T. (2005). The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J. Biol. Chem.* **280**, 11134-11139.

- Lutz, S., Shankaranarayanan, A., Coco, C., Ridilla, M., Nance, M. R., Vettel, C., Baltus, D., Evelyn, C. R., Neubig, R. R., Wieland, T., Tesmer, J. J. (2007).** Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* **318**, 1923-1927.
- Maceyka, M., Payne, S. G., Milstien, S., Spiegel, S. (2002).** Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1585**, 193-201.
- Maceyka, M., Nava, V. E., Milstien, S., Spiegel, S. (2004).** Aminoacylase 1 is a sphingosine kinase 1-interacting protein. *FEBS Lett.* **568**, 30-34.
- Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N. C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L. S., Merrill, A. H. Jr., Milstien, S., Spiegel, S. (2005).** SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* **280**, 37118-37129.
- MacLennan, A. J., Marks, L., Gaskin, A. A., Lee, N. (1997).** Embryonic expression pattern of H218, a G-protein coupled receptor homolog, suggests roles in early mammalian nervous system development. *Neuroscience* **79**, 217-224.
- MacLennan, A. J., Carney, P. R., Zhu, W. J., Chaves, A. H., Garcia, J., Grimes, J. R., Anderson, K. J., Roper, S. N., Lee, N. (2001).** An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 203-209.
- Malek, R. L., Toman, R. E., Edsall, L. C., Wong, S., Chiu, J., Letterle, C. A., Van Brocklyn, J. R., Milstien, S., Spiegel, S., Lee, N. H. (2001).** Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 5692-5699.
- Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., Wallach, D. (1997).** MAP3K-related kinase involved in NF-kappa B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* **385**, 540-544.
- Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H., van De Vijver M. J., Scheper R. J., Schellens J. H. (2001).** Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **61**, 3458-3564.
- Mandala, S. M., Thornton, R., Galve-Roperh, I., Poulton, S., Peterson, C., Olivera, A., Bergstrom, J., Kurtz, M. B., Spiegel, S. (2000).** Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *PNAS* **97**, 7859-7864.
- Manggau, M., Kim, D. S., Ruwisch, L., Vogler, R., Korting, H. C., Schäfer-Korting, M., Kleuser, B. (2001).** 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosine-1-phosphate. *J. Invest Dermatol.* **117**, 1241-1249.
- Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., Cyster, J. G. (2004).** Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355-360.

- McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J., Lefkowitz, R. J. (2000).** Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**, 1574-1577.
- McGiffert, C., Contos, J. J., Friedman, B., Chun, J. (2002).** Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for s1p(1) in neurogenesis and s1p(1-3) in angiogenesis. *FEBS Lett.* **531**, 103-108.
- Melendez, A., Floto, R. A., Gilloly, D. J., Harnett, M. M., Allen, J. M. (1998).** F ϵ RI coupling to phospholipase D initiates sphingosine kinase-mediated calcium mobilization and vesicular trafficking. *J. Biol. Chem.* **273**, 9393-9402.
- Melendez, A., Carlos-Dias, E., Gosink, M., Allen, J. M., Takacs, L. (2000).** Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene* **251**, 19-26.
- Melendez, A., Khaw, K. A., (2002).** Dichotomy of Ca²⁺ signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. *J. Biol. Chem.* **10**, 17255-17262.
- Melendez, A. J., Ibrahim, F. B. (2004).** Antisense knockdown of sphingosine kinase 1 in human macrophages inhibits C5a receptor-dependent signal transduction, Ca²⁺ signals, enzyme release, cytokine production, and chemotaxis. *J. Immunol.* **173**, 1596-1603.
- Mendel, J., Heinecke, K., Fyrst, H., Saba, J. D. (2003).** Sphingosine phosphate lyase expression is essential for normal development in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **278**, 22341-22349.
- Meschini, S., Calcabrini, A., Monti, E., Del Bufalo, D., Stringaro, A., Dolfini, E., Arancia, G. (2000).** Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer.* **87**, 615-628.
- Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H., van Koppen, C. J. (1998).** Sphingosine kinase mediated Ca²⁺ signalling by G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **17**, 2830-2837.
- Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Kuchar, I., Alemany, R., Guo, Y., Schmidt, M., Jakobs, K. H. (1999).** Role of sphingosine kinase in Ca²⁺ signalling by epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* **461**, 217-222.
- Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Kuchar, I., Lipinski, M., Alemany, R., Rumenapp, U., Jakobs, K. H. (2001).** Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **414**, 145-154.
- Meyer zu Heringdorf, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J. H., Tigyi, G., Jakobs, K. H. (2003a).** Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca²⁺ mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **554**, 443-449.

- Meyer zu Heringdorf, D., Vincent, M. E., Lipinski, M., Danneberg, K., Stropp, U., Wang, D., Tigyi, G., Jakobs, K. H. (2003b). Inhibition of Ca^{2+} signalling by the sphingosine 1-phosphate receptor S1P₁. *Cell. Signal.* **15**, 677-687.
- Meyer zu Heringdorf, D. (2004). Lysophospholipid receptor-dependent and -independent calcium signaling. *J. Cell. Biochem.* **92**, 937-948.
- Meyer zu Heringdorf, D., Jakobs, K. H. (2007). Lysophospholipid receptors: Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 923-940.
- Milstien, S., Spiegel, S. (2006). Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics. *Cancer Cell.* **9**, 148-150.
- Mitra, P., Oskeritzian, C. A., Payne, S. G., Beaven, M. A., Milstien, S., Spiegel, S. (2006). Role of ABCG1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 16394-16399.
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G. F., Spiegel, S., Proia, R. L. (2005). Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 11113-11121.
- Mulders, A. C. M. (2007). Sphingolipid metabolism in vascular function. Dissertation an der Universität von Amsterdam, Niederlande
- Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., Norris, M. (2007). Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life* **59**, 752-757.
- Naetzker, S., Hagen, N., Echten-Deckert, G. (2006). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and partial reactivation of the cell cycle by cis-4-methylsphingosine direct postmitotic neurons towards apoptosis. *Genes Cells* **11**, 269-279.
- Nakade, Y., Banno, Y., T-Koizumi, K., Hagiwara, K., Sobue, S., Koda, M., Suzuki, M., Kojima, T., Takagi, A., Asano, H., Nozawa, Y., Murate, T. (2003). Regulation of sphingosine kinase 1 gene expression by protein kinase C in a human leukemia cell line, MEG-O1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1635**, 104-116.
- Nava, V. E., Lacana, E., Poulton, S., Liu, H., Sugiura, M., Kono, K., Milstien, S., Kohama, T., Spiegel, S. (2000). Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett.* **473**, 81-84.
- Niedernberg, A., Scherer, C. R., Busch, A. E., Kostenis, E. (2002). Comparative analysis of human and rat S1P(5) (edg8): differential expression profiles and sensitivities to antagonists. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 1243-1250.
- Nofer, J. R., van der, G. M., Tolle, M., Wolinska, I., von Wnuck, L. K., Baba, H. A., Tietge, U. J., Godecke, A., Ishii, I., Kleuser, B., Schafers, M., Fobker, M., Zidek, W., Assmann, G., Chun, J., Levkau, B. (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P₃. *J. Clin. Invest.* **113**, 569-581.

- Okajima, F. (2002).** Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 132-137.
- Okamoto, H., Takuwa, Y., Gonda, K., Okazaki, H., Chang, K., Yatomi, Y., Shigematsu, H. (1998).** Edg-1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a G_{i/o} to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca²⁺ mobilization, ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *J. Biol. Chem.* **273**, 27104-27110.
- Okamoto, H., Takuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematsu, H., Takuwa, Y. (2000).** Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 9247-9261.
- Olivera, A., Spiegel, S. (1993).** Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* **365**, 557-560.
- Olivera, A., Rosenthal, J., Spiegel, S. (1996).** Effect of acidic phospholipids on sphingosine kinase. *J. Cell. Biochem.* **60**, 529-537.
- Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., Spiegel, S. (1998).** Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 12576-12583.
- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., Spiegel, S. (1999).** Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell. Biol.* **147**, 545-558.
- Olivera, A., Spiegel, S. (2001).** Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins* **64**, 123-134.
- Olivera, A., Rosenfeldt, H. M., Bektas, M., Wang, F., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S., Spiegel, S. (2003).** Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 46452-46460.
- Olivera, A., Urtz, N., Mizugishi, K., Yamashita, Y., Gilfillan, A. M., Furumoto, Y., Gu, H., Proia, R. L., Baumruker, T., Rivera, J (2006).** IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses. *J. Biol. Chem.* **281**, 2515-2525.
- Oskouian, B., Sooriyakumaran, P., Borowsky, A. D., Crans, A., Dillard-Telm, L., Tam, Y. Y., Bandhuvula, P., Saba, J. D. (2006).** Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 17384-17389.
- Oskouian, B., Saba, J. (2007).** Sphingosine-1-phosphate metabolism and intestinal tumorigenesis: lipid signaling strikes again. *Cell Cycle* **6**, 522-527.

- Parrill, A. L., Wang, D., Bautista, D. L., Van Brocklyn, J. R., Lorincz, Z., Fischer, D. J., Baker, D. L., Liliom, K., Spiegel, S., Tigyi, G. (2000). Identification of Edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **275**, 39379-39384.
- Paugh, S. W., Payne, S. G., Barbour, S. E., Milstien, S., Spiegel, S. (2006). The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase 2. *FEBS Lett.* **554**, 189-193.
- Peest, U., Sensken, S. C., Andréani, P., Hänel, P., Van Veldhoven, P. P., Gräler, M. H. (2008). S1P-lyase independent clearance of extracellular sphingosine 1-phosphate after dephosphorylation and cellular uptake. *J. Biol. Chem.* (im Druck, doi:10.1002/jcb.21665)
- Pinschewer, D. D., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Brinkmann, V., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. (2000). FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. *J. Immunol* **164**, 5761-5770.
- Pitson, S. M., D'Andrea, R. J., Vandeleur, L., Moretti, P. A. B., Xia, P., Gamble, J. R. (2000a). Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochem. J.* **350**, 429-441.
- Pitson, S. M., Moretti, P. A. B., Zebol, J. R., Xia, P., Gamble, J. R., Vadas, M. A., D'Andrea, R. J., Wattenberg, B. W. (2000b). Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation: a dominant-negative sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33945-33950.
- Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Zareie, R., Derian, C. K., Darrow, A. L., Qi, J., D'Andrea, R. J., Bagley, C. J., Vadas, M. A., Wattenberg, B. W. (2002). The nucleotide-binding site of human sphingosine kinase 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 49545-49553.
- Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Xia, P., Vadas, M. A., Wattenberg, B. W. (2003). Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* **22**, 491-500.
- Pitson, S. M., Xia, P., Leclercq, T. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Wattenberg, B. W., Vadas, M. A. (2005). Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J. Exp. Med.* **201**, 49-54.
- Pyne, S., Pyne, N. J. (2000). Sphingosine-1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem. J.* **349**, 385-402.
- Pyne, S., Pyne, N. J. (2002). Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 121-131.
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* **33**, 49-54.
- Reiss, U., Oskouian, B., Zhou, J., Gupta, V., Sooriyakumaran, P., Kelly, S., Wang, E., Merrill, A. H. Jr., Saba J. D. (2004). Sphingosine-phosphate lyase enhances stress-induced ceramide generation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 1281-1290.

- Rosen, H., Goetzl, E. J. (2005).** Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 560-570.
- Rozengurt, E., Rey, O., Waldron, R. T. (2005).** Protein kinase D signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 13205-13208.
- Saba, J. D., Hla, T. (2004).** Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circ. Res.* **94**, 724-734.
- Safadi-Chamberlain, F., Wang, L. P., Payne, S. G., Lim, C. U., Stratford, S., Chavez, J. A., Fox, M. H., Spiegel, S., Summers, S. A. (2005).** Effect of a membrane-targeted sphingosine kinase 1 on cell proliferation and survival. *Biochem. J.* **388**, 827-834.
- Sanchez, T., Estrada-Hernandez, T., Paik, J.H., Wu, M.T., Venkataraman, K., Brinkmann, V., Claffey, K., Hla, T. (2003).** Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor induced vascular permeability. *J. Biol. Chem.* **278**, 47281-47290.
- Sanna, M. G., Liao, J., Jo, E., Alfonso, C., Ahn, M. Y., Peterson, M. S., Webb, B., Lefebvre, S., Chun, J., Gray, N., Rosen, H. (2004).** Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P₁ and S1P₃, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J. Biol. Chem.* **279**, 13839-13848.
- Sauer, B., Vogler, R., von Wenckstern, H., Fujii, M., Anzano, M. B., Glick, A. B., Schafer-Korting, M., Roberts, A. B., Kleuser, B. (2004).** Involvement of Smad signaling in sphingosine 1-phosphate-mediated biological responses of keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 38471-38479.
- Schmahl, J., Raymond, C. S., Soriano, P. (2007).** PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nat. Genet.* **39**, 52-60.
- Schmidt, M., Hüwe, S. M., Fasselt, B., Homann, D., Rügenapp, U., Sandmann, J., Jakobs, K. H. (1994).** Mechanisms of phospholipase D stimulation by m3 muscarinic acetylcholine receptors. Evidence for involvement of tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **225**, 667-675.
- Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., Cyster, J. G. (2005).** Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* **309**, 1735-1739.
- Shapiro, A. B., Fox, K., Lee, P., Yang, Y. D., Ling, V. (1998).** Functional intracellular P-glycoprotein. *Int. J. Cancer.* **76**, 857-864.
- Siehler, S., Manning, D. R. (2002).** Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 94-99.
- Sinnecker, D., Schaefer, M. (2004).** Real-time analysis of phospholipase C activity during different patterns of receptor-induced Ca²⁺ responses in HEK293 cells. *Cell. Calcium* **35**, 29-38.

- Spiegel, S. (1999).** Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 341-344.
- Spiegel, S., Milstien, S. (2000).** Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1484**, 107-116
- Spiegel, S., Milstien, S. (2002).** Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* **277**, 25851-25854.
- Spiegel, S., Milstien, S. (2003).** Sphingosine-1-phosphate: An enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 397-407.
- Spiegel, S., Milstien, S. (2006).** Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *J. Biol. Chem.* **282**, 2125-2129.
- Stahelin, R. V., Hwang, J. H., Kim, J. H., Park, Z. Y., Johnson, K. R., Obeid, L. M., Cho, W. (2005).** The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1. *J. Biol. Chem.* **280**, 43030-43038.
- Stehlik, C., Martin, R. de, Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R., Li (1998).** Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-link iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **188**, 211-216.
- Taha, T. A., Argraves, K. M., Obeid, L. M. (2004).** Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim. Biophys. Acta* **1682**, 48-55.
- Taha, T. A., Hannun, Y. A., Obeid, L. M. (2006).** Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation in disease. *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 113-131.
- Tanimoto, T., Jin, Z. G., Berk, B. C. (2002).** Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J. Biol. Chem.* **277**, 42997-43001.
- Toman, R. E., Payne, S. G., Watterson, K. R., Maceyka, M., Lee, N. H., Milstien, S., Bigbee, J. W., Spiegel, S. (2004).** Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *J. Cell. Biol.* **166**, 381-392.
- Uhlenbrock, K., Gassenhuber, H., Kostenis, E. (2002).** Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr 12 family of constitutively active G-protein-coupled receptors. *Cell. Signal.* **14**, 941-953.
- Van Aelst, L., D'Souza-Schorey, C. (1997).** Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**, 2295-2322.
- Van Brocklyn, J. R., Lee, M.-J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Liu, C. H., Hla, T., Spiegel, S. (1998).** Dual actions of sphingosine-1-phosphate: Extracellular through the G_i-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J. Cell Biol.* **142**, 229-240.

van Echten-Deckert, G., Zschoche, A., Bär, T., Schmidt, R. R., Raths, A., Heinemann, T., Sandhoff, K. (1997). cis-4-Methylsphingosine decreases sphingolipid biosynthesis by specifically interfering with serine palmitoyltransferase activity in primary cultured neurons. *J. Biol. Chem.* **272**, 15825-15833.

van Echten-Deckert, G., Schick, A., Heinemann, T., Schnieders, B. (1998). Phosphorylated cis-4-methylsphingosine mimics the mitogenic effect of sphingosine-1-phosphate in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **273**, 23585-23589.

Van Luyn, M. J., Müller, M., Renes, J., Meijer, C., Scheper, R. J., Nienhuis, E. F., Mulder, N. H., Jansen, P. L., De Vries, E. G. (1998). Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug-resistance protein 1. *Int. J. Cancer.* **76**, 55-62.

Van Veldhoven, P. P., Mannaerts, G. P. (1991). Subcellular Localization and Membrane Topology of Sphingosine-1-phosphate Lyase in Rat Liver. *J. Biol. Chem.* **266**, 12502-12507.

Van Veldhoven, P. P., Gijssbers, S., Mannaerts, G. P., Vermeesch, J. R., Brys, V. (2000). Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22. *Biochim. Biophys. Acta* **1487**, 128-134.

Van Veldhoven, P. P. (2000). Sphingosine-1-phosphate lyase. *Methods Enzymol.* **311**, 244-254.

Van Veldhoven, P. P. (2005). Sphingosine 1-phosphate lyase deficient mice. *Chem. Phys. Lipids* **136**, 164-165.

Vogler, R., Sauer, B., Kim, D.S., Schafer-Korting, M., Kleuser, B. (2003). Sphingosine-1-phosphate and its potentially paradoxical effects on critical parameters of cutaneous wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 693-700.

Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., Baldwin, A. S. Jr. (1998). NFkappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAFc-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680-1683.

Wang, W., Graeler, M. H., Goetzl, E. J. (2005). Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J.* **19**, 1731-1733.

Waters, C., Sambhi, B., Kong, K. C., Thompson, D., Pitson, S. M., Pyne, S., Pyne, N. J. (2003). Sphingosine 1-phosphate and platelet-derived growth factor (PDGF) act via PDGF beta receptor-sphingosine 1-phosphate receptor complexes in airway smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 6282-6290.

Waters, C. M., Long, J., Gorshkova, I., Fujiwara, Y., Connell, M., Belmonte, K. E., Tigyi, G., Natarajan, V., Pyne, S., Pyne, N. J. (2006). Cell migration activated by platelet-derived growth factor receptor is blocked by an inverse agonist of the sphingosine 1-phosphate receptor-1. *FASEB J.* **20**, 509-511.

- Wattenberg, B. W., Pitson, S. M., Raben, D. M. (2006).** The sphingosine and diacylglycerol kinase superfamily of signaling kinases: localization as a key to signaling function. *J. Lipid Res.* **47**, 1128-1139.
- Watterson, K. R., Johnston, E., Chalmers, C., Pronin, A., Cook, S. J., Benovic, J. L., Palmer, T. M. (2002).** Dual regulation of EDG1/S1P(1) receptor phosphorylation and internalization by protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **277**, 5767-5777.
- Windh, R. T., Lee, M.-J., Hla, T., An, S., Barr, A. J., Manning, D. R. (1999).** Differential coupling of the sphingosine-1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G_i, G_q, and G₁₂ families of heterotrimeric G-proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 27351-27358.
- Wioland, M. A., Fleury-Feith, J., Corlieu, P., Commo, F., Monceaux, G., Lacau-St-Guily, J., Bernaudin, J. F. (2000).** CFTR, MDR1, and MRP1 immunolocalization in normal human nasal respiratory mucosa. *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 1215-1222.
- Xia, P., Gamble, J. R., Wang, L., Pitson, S. M., Moretti, P. A. B., Wattenberg, B. W., D'Andrea, R. J., Vadas, M. A. (2000).** An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr. Biol.* **10**, 1527-1530.
- Xia, P., Wang, L., Moretti, P. A., Albanese, N., Chai, F., Pitson, S. M., D'Andrea, R. J., Gamble, J. R., Vadas, M. A. (2002).** Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor- α signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 7996-8003.
- Xin, C., Ren, S., Kleuser, B., Shabahang, S., Eberhardt, W., Radeke, H., Schafer-Korting, M., Pfeilschifter, J., Huwiler, A. (2004).** Sphingosine 1-phosphate cross activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor- β -induced cell responses. *J. Biol. Chem.* **279**, 35255-35262.
- Yang, L., Yatomi, Y., Miura, Y., Satoh, K., Ozaki, Y. (1999).** Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells. *Br. J. Haematol.* **107**, 282-293.
- Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S., Igarashi, Y. (1995).** Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* **86**, 193-202.
- Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., Kume, S. (1997).** Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J. Biochem.* **121**, 969-973.
- Yatomi, Y., Ozaki, Y., Ohmori T., Igarashi, Y. (2001).** Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins* **64**, 107-122.
- Yokota, S., Taniguchi, Y., Kihara, A., Mitsutake, S., Igarashi, Y. (2004).** Asp177 in C4 domain of mouse sphingosine kinase 1a is important for the sphingosine recognition. *FEBS Lett.* **578**, 106-110.

Yoshimoto, T., Furuhata, M., Kamiya, S., Hisada, M., Miyaji, H., Magami, Y., Yamamoto, K., Fujiwara, H., Mizuguchi, J. (2003). Positive modulation of IL-12 signaling by sphingosine kinase 2 associating with the IL-12 receptor beta 1 cytoplasmic region. *J. Immunol.* **171**, 1352-1359.

Young, K. W., Nahorski, S. R. (2001). Intracellular sphingosine 1-phosphate production: a novel pathway for Ca²⁺ release. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **12**, 19-25.

Young, K. W., Willets, J. M., Parkinson, M. J., Bartlett, P., Spiegel, S., Nahorski, S. R., Challiss, R. A. (2003). Ca²⁺/calmodulin-dependent translocation of sphingosine kinase: role in plasma membrane relocation but not activation. *Cell. Calcium.* **33**, 119-128.

Yuan, J., Rey, O., Rozengurt, E. (2005). Protein kinase D3 activation and phosphorylation by signaling through G alpha q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 270-276.

Zemann, B., Kinzel, B., Muller, M., Reuschel, R., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., Bornancin, F., Baumruker, T., Billich, A. (2006). Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood* **15**, 1454-1458.

Zhang, H., Desai, N. N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G., Spiegel, S. (1991). Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J. Cell. Biol.* **114**, 155-167.

Zondag, G. C. M., Postma, F. R., van Etten, I., Verlaan, I., Moolenaar, W. H. (1998). Sphingosine-1-phosphate signalling through the G protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem. J.* **330**, 605-609.

8. Anhang

Eigene Publikationen

Lichte, K.; Rossi, R.; Danneberg, K.; ter Braak, M.; Kürschner, U.; Jakobs, K. H.; Kleuser, B.; Heringdorf, D. M. (2008). Lysophospholipid Receptor-Mediated Calcium Signaling in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* (im Druck; doi:10.1038/sj.jid.5701207)

Gelius-Dietrich, G.; ter Braak, M.; Henze, K. (2007). Mitochondrial steps of arginine biosynthesis are conserved in the hydrogenosomes of the chytridiomycete *Neocallmastix frontalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **54**, 42-44.

Aleman, R.; van Koppen, C. J.; Danneberg, K.; Ter Braak, M.; Meyer zu Heringdorf, D. (2007). Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **374**, 413-428.

Abstracts

Hegen, B.; ter Braak, M.; Hardel, V.; Hla, T.; Jakobs, K. H.; Meyer zu Heringdorf, D. (2008). Role of Sphingosine Kinase-1 in Calcium Signalling and Growth of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (im Druck)

ter Braak, M.; Hardel, V.; Jakobs, K. H.; Van Veldhoven, P. P.; Meyer zu Heringdorf, D. (2008). Altered calcium signalling in mouse embryonic fibroblasts deficient in sphingosine-1-phosphate lyase. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (im Druck)

Peters, S. L. M.; Mulders, A. C. M.; Mathy, M. J.; Meyer zu Heringdorf, D.; ter Braak, M.; Hajji, N.; Olthof, D. C.; Michel, M. C.; Alewijnse, A. E. Enhancement of NO-mediated and attenuation of EDHF-mediated vasorelaxation via activation of sphingosine kinase by muscarinic receptor stimulation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (im Druck)

Ter Braak, M.; Moorkamp, C.; Liphardt, K.; Jakobs, K. H.; Meyer zu Heringdorf, D. (2006). The M₃ muscarinic receptor causes internalization of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors via local S1P production. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **372 Suppl 1**, 31.

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. H. Jakobs ganz herzlich.

Ganz besonders möchte ich Frau Prof. Dr. D. Meyer zu Heringdorf für ihre zuvorkommende Hilfsbereitschaft und die fachkompetente Betreuung dieser Arbeit danken.

Für die Mitarbeit, an den in der Arbeit vorkommenden Versuchsreihen möchte ich Frau C. Häusler, Frau D. Petermeyer, Frau K. Liphardt, Frau B. Hegen und Frau B. Mause danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. A. Weber und allen weiteren Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie für die Unterstützung und die ständig offenen Ohren. Durch das gute Arbeitsverhältnis und die zahllosen kleinen Tipps wurde einem das Arbeiten stets erleichtert.

Frau Priv. Doz. Dr. G. van Echten-Deckert, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn danke ich für die Bereitstellung des cis-4-Methylsphingosins.

Meiner Freundin danke ich von ganzem Herzen für ihre immer liebevolle Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und dass sie während der Niederschrift „Durch Dick und Dünn“ mit mir gegangen ist.

Last but not least möchte ich mich bei...

...meiner Familie, meinen Freunden und Bekannten für ihre freundschaftliche Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Nachname
Geburtsdatum
Staatsangehörigkeit

Michael ter Braak
15. Juni 1977 in Oberhausen
deutsch

Schulbildung

08/1987 bis 06/1996
Abschluss

Gymnasium in Oberhausen
Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/1996 bis 09/1997

Betreuung von Menschen mit Behinderung in einer
Behindertenwerkstatt in Oberhausen

Hochschulstudium

10/1997 bis 08/2004

Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-
Universität in Düsseldorf

Schwerpunkte

Hauptfach: Botanik
1. Nebenfach: Biochemie
2. Nebenfach: Organische Chemie

Diplomarbeit

Am Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie der
Heinrich-Heine-Universität unter Leitung von Herrn
Prof. Dr. W. Martin

Thema

"Arginin-Dihydrolase Weg und Harnstoffzyklus in
dem anaeroben Chytridiomyceten *Neocallimastix
frontalis*"

Abschluss

Diplom

Promotion

seit 05/2005

An dem Universitätsklinikum Essen im Institut für
Pharmakologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K.
H. Jakobs

Thema

„Regulation zellulärer Funktionen durch Enzyme des
Sphingosin-1-Phosphat-Metabolismus“

Oberhausen, 28. März 2008

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 30. März 2008

(Michael ter Braak)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Regulation zellulärer Funktionen durch Enzyme des Sphingosin-1-Phosphat-Metabolismus“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Michael ter Braak befürworte.

Essen, 30. März 2008

(Prof. Dr. K. H. Jakobs)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 30. März 2008

(Michael ter Braak)