

Regulation der Sphingosinkinase-1 durch $G\alpha_q$

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Ralf Frederik Claas
aus Krefeld

Frankfurt am Main, 2012
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Holger Stark
Prof. Dr. Dagmar Meyer zu Heringdorf

Datum der Disputation:

| | | |
|-----------|--|----|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Sphingolipid-Stoffwechsel | 2 |
| 1.2. | Sphingosin-1-Phosphat-Lyase..... | 2 |
| 1.3. | Sphingosinkinase-1 | 4 |
| 1.4. | Intrazelluläre Wirkung von SIP | 6 |
| 1.5. | Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren und -Rezeptoragonisten..... | 7 |
| 1.6. | G _q -Signalwege..... | 8 |
| 1.7. | Fragestellung | 10 |
| 2. | Material und Methoden | 13 |
| 2.1. | Material | 13 |
| 2.1.1. | Chemikalien | 13 |
| 2.1.2. | Zelllinien | 15 |
| 2.1.3. | Medien und Zusätze | 15 |
| 2.1.4. | Erstantikörper | 16 |
| 2.1.5. | Zweitantikörper | 16 |
| 2.1.6. | Restriktionsenzyme | 16 |
| 2.1.7. | Vektoren | 16 |
| 2.1.8. | E.coli Stämme | 17 |
| 2.1.9. | Primer (MWG Operon) | 18 |
| 2.1.10. | rekombinante Proteine..... | 18 |
| 2.1.11. | Radiochemikalien..... | 18 |
| 2.1.12. | Häufig verwendete Pufferlösungen | 19 |
| 2.1.12.1. | Proteinbestimmung..... | 19 |
| 2.1.12.2. | Calciummessung | 19 |
| 2.1.12.3. | Agarosegel..... | 20 |
| 2.1.12.4. | Nährmedien für Bakterien..... | 20 |
| 2.1.12.5. | Medien zur Herstellung kompetenter Bakterien | 20 |
| 2.1.12.6. | Proteinaufreinigung..... | 21 |
| 2.1.12.7. | Sphingosinkinase-1-Aktivitätsassay..... | 23 |
| 2.1.12.8. | Western Blot..... | 23 |
| 2.1.12.9. | Thermophorese..... | 25 |
| 2.1.13. | Geräte | 25 |
| 2.1.14. | Kits | 25 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.2. | Methoden..... | 26 |
| 2.2.1. | Zellkultur..... | 26 |
| 2.2.2. | Cameleon Calciumsensor..... | 26 |
| 2.2.3. | Lipidextraktion..... | 27 |
| 2.2.4. | PCR-Klonierung der SK1..... | 29 |
| 2.2.5. | Vektorverdau und PCR-Produktverdau..... | 29 |
| 2.2.6. | Gelelektrophorese..... | 29 |
| 2.2.7. | Restriktionsverdau..... | 30 |
| 2.2.8. | Ligation und Hitzeschocktransformation..... | 30 |
| 2.2.9. | Kompetente Bakterienstämme und Elektroporation..... | 30 |
| 2.2.10. | Proteinexpression und -aufreinigung..... | 31 |
| 2.2.10.1. | Bakterielle Expression von hSK1-pMCSG9..... | 31 |
| 2.2.10.2. | Aufreinigung der hSK1 über Amylose..... | 31 |
| 2.2.10.3. | Aufreinigung der hSK1 über Ni-NTA..... | 32 |
| 2.2.11. | Proteinbestimmung nach Bradford..... | 32 |
| 2.2.12. | Sphingosinkinase-1-Assay..... | 32 |
| 2.2.13. | Messung der Microscale Thermophorese..... | 33 |
| 2.2.14. | Transfektion mit Lipofectamin 2000 und TurboFect..... | 33 |
| 2.2.15. | Messung der SK1-Translokation..... | 34 |
| 2.2.16. | Immunfärbung und Fluoreszenzaufnahmen..... | 34 |
| 2.2.17. | Phospholipase C-Assay..... | 34 |
| 2.2.18. | Western Blotting..... | 35 |
| 2.2.19. | Statistische Auswertung..... | 36 |
| 3. | Ergebnisse..... | 37 |
| 3.1. | Charakterisierung von S1P-Lyase-defizienten MEFs..... | 37 |
| 3.1.1. | Konzentrationen von S1P und Sphingosin in S1P-Lyase-defizienten MEFs .. | 37 |
| 3.1.2. | Ca ²⁺ -Homöostase in S1P-Lyase-defizienten MEFs auf Einzelzellebene..... | 39 |
| 3.2. | Nachweis der autokrinen Sekretion von cis-4-Methylsphingosin-1-Phosphat..... | 45 |
| 3.3. | Regulation der SK1 durch G α_q | 48 |
| 3.3.1. | Hemmung der SK1-Translokation durch katalytisch inaktive GRK2..... | 48 |
| 3.3.2. | Einfluss des PIP ₂ -Gehaltes der Plasmamembran auf die Translokationsgeschwindigkeit der SK1..... | 50 |
| 3.3.3. | Einfluss der SK1-Überexpression auf die G α_q -vermittelte Aktivierung der PLC β | 53 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3.3.4. | Abhängigkeit der durch den B ₂ -Rezeptor stimulierten SK1-Translokation von Gα _q | 56 |
| 3.3.5. | Kopplung des S1P ₁ -Rezeptors an die SK1 durch eine Chimäre aus Gα _i und Gα _q | 59 |
| 3.3.6. | Reinigung der SK1 aus E. coli | 62 |
| 3.3.7. | Funktionelle Charakterisierung der bakteriell exprimierten hSK1 | 64 |
| 3.3.8. | Untersuchung der direkten Interaktion von SK1 und Gα _q mit optischer Thermophorese..... | 69 |
| 4. | Diskussion | 74 |
| 4.1. | Charakterisierung von S1P-Lyase-defizienten MEFs | 74 |
| 4.2. | Nachweis der autokrinen Sekretion von cis-4-Methylsphingosin-1-Phosphat | 78 |
| 4.3. | Charakterisierung und funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen Sphingosinkinase-1 und Gα _q | 80 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 89 |
| 6. | Literaturverzeichnis..... | 91 |
| 7. | Abkürzungen | 109 |
| 8. | Eigene Publikationen..... | 112 |
| 8.1. | Originalpublikationen..... | 112 |
| 8.2. | Kongressbeiträge..... | 112 |
| 9. | Erklärung..... | 113 |
| 10. | Lebenslauf | 114 |

1. Einleitung

Sphingolipide sind ubiquitäre Bestandteile von Plasmamembranen. Von ihrem Entdecker Johann Ludwig Wilhelm Thudichum wurden sie aufgrund ihrer zunächst rätselhaften Struktur nach der zentralen Figur der ägyptischen Mythologie, der Sphinx, benannt (Thudichum 1884). Sie unterscheiden sich von anderen Membranbestandteilen wie Glycerolipiden oder Isoprenoiden durch einen Aminoalkohol als Grundgerüst. Unter allen Sphingolipiden ist Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in den Fokus des Forschungsinteresses gerückt, weil es fundamentale Prozesse wie Migration, Proliferation, Adhäsion und Apoptose reguliert (Spiegel und Milstien 2003). Eine Dysregulation des S1P-Metabolismus wird mit einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter Krebs, Arteriosklerose und Asthma (Pyne und Pyne 2010; Takabe et al. 2008). S1P wird durch die Sphingosinkinasen 1 und 2 (SK1 und SK2) aus Sphingosin gebildet, der Abbau erfolgt entweder reversibel durch die S1P-Phosphatasen (SPP1 und 2) und Lysophosphatidphosphatasen (LPPs) oder irreversibel durch Spaltung der 4,5-trans-Doppelbindung durch die S1P-Lyase. Die Wirkung von S1P auf Zellen und Organe ist sowohl von der Expression der metabolisierenden Enzyme als auch von der Expression der Rezeptoren für S1P abhängig. S1P bindet extrazellulär an fünf verschiedene G-Proteingekoppelte Rezeptoren der *Endothelial differentiation gene (Edg)* Familie, zu der auch die Rezeptoren für die verwandte Lysophosphatidsäure (LPA) gehören (Chun et al. 2010). Zusätzlich vermittelt S1P auch intrazelluläre Effekte. So wurde bereits gezeigt, dass S1P Histondeacetylasen (HDACs) inhibiert sowie einen essenziellen Cofaktor für die TNF- α -induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor κ B* (NF- κ B) darstellt (Alvarez et al. 2010; Hait et al. 2009). S1P ist folglich zweierlei: ein Rezeptoragonist und ein klassischer *second messenger*.

Ausgehend vom Naturstoff Myriocin wurde das Sphingosinstrukturanalogon Fingolimod (FTY720, Gilenya[®]) zur Therapie der multiplen Sklerose entwickelt, das nach intrazellulärer Phosphorylierung alle S1P-Rezeptoren mit Ausnahme des S1P₂-Rezeptors agonisiert und im Gegensatz zu bisherigen Therapieformen oral bioverfügbar ist (Ingwersen et al. 2011). Die immunmodulierende Wirkung basiert auf der Internalisierung und damit auf dem funktionellen Antagonismus des S1P₁-Rezeptors auf T-Lymphozyten, der dazu führt, dass die T-Lymphozyten auch nach Aktivierung in den Lymphknoten verbleiben und nicht in Entzündungsherde auswandern. Da die Multiple Sklerose in Industrieländern eine hohe

Prävalenz hat, wird aktuell an spezifischen S1P₁-Rezeptoragonisten geforscht (Brinkmann et al. 2010).

1.1. Sphingolipid-Stoffwechsel

Ceramid ist der zentrale Baustein des Sphingolipidmetabolismus (Pitson 2011). Die *de novo*-Synthese von Ceramid findet an der cytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Dort werden Serin und Palmitoyl-CoA durch die Serin-Palmitoyltransferase zu 3-Ketodihydrosphingosin kondensiert, welches anschließend zu Dihydrosphingosin reduziert wird. Die Ceramidsynthase N-acyliert Dihydrosphingosin zu Dihydroceramid, welches durch eine Desaturase zu Ceramid oxidiert wird. Ausgehend vom Ceramid findet am Golgiapparat die Biosynthese von Sphingomyelin durch die Sphingomyelinsynthase und von komplexen Glycosphingolipiden durch die Glucosylceramidsynthase statt.

Ceramid kann durch die Ceramidkinase phosphoryliert oder durch die Ceramidase zu Sphingosin abgebaut werden. Sphingosin selbst wird durch zwei verschiedene Kinasen, die Sphingosinkinase-1 (SK1) und die Sphingosinkinase-2 (SK2), zu S1P phosphoryliert. S1P kann dann entweder irreversibel durch die S1P-Lyase zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin abgebaut werden oder durch SPPs und LPPs dephosphoryliert und anschließend durch Ceramidsynthasen wieder zu Ceramid aufgebaut werden.

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Sphingosin und Ceramid eine pro-apoptotische Wirkung besitzen, während S1P anti-apoptotisch wirkt. Deshalb wurde die Theorie entwickelt, dass das Verhältnis von Sphingosin und Ceramid zu S1P darüber entscheidet, ob eine Zelle überlebt oder in den programmierten Zelltod geht (*Sphingolipid rheostat model*) (Cuvillier et al. 1996).

1.2. Sphingosin-1-Phosphat-Lyase

Die S1P-Lyase katalysiert den letzten Schritt des S1P-Abbaus. Im Gegensatz zu den S1P-Phosphatasen, die reversibel die Phosphatgruppe abspalten, spaltet die S1P-Lyase S1P irreversibel an der 4,5-trans-Doppelbindung und ist damit als einziges Enzym in der Lage, das SphingosinGrundgerüst abzubauen (Kumar und Saba 2009). Das neben Phosphoethanolamin erhaltene Produkt Hexadecenal spielt wie S1P eine Rolle als bioaktiver Mediator. So wurde gezeigt, dass Hexadecenal MAP-Kinase-Signalwege aktiviert und damit eine Reorganisation

des Cytoskeletts und Apoptose induziert (Kumar et al. 2011). Die S1P-Lyase ist ein 568 Aminosäuren großes Protein mit einer Masse von 63,5 kDa, das am ER verankert ist. Der N-terminale Teil des Proteins durchspannt einmal die Membran des ER, während der katalytisch aktive Teil im Cytosol liegt (Ikeda et al. 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass die S1P-Lyase als Dimer vorliegt (Bourquin et al. 2010). Die Expression der S1P-Lyase ist im Thymus sehr hoch, um eine möglichst geringe Konzentration an S1P zu gewährleisten. Gleichzeitig wird die S1P-Lyase in Lymphozyten nur gering und in Erythrozyten und Blutplättchen nicht exprimiert, so dass Blutzellen neben dem Gefäßendothel die wichtigste Quelle für Plasma-S1P darstellen (Bode et al. 2010; Ito et al. 2007; Venkataraman et al. 2008). Der Gradient zwischen niedriger S1P-Konzentration in den Lymphknoten (nanomolare Konzentration) und hoher S1P-Konzentration im Blut (0,1 bis 1,2 μM) ist für die Auswanderung von reifen T-Lymphozyten von entscheidender Bedeutung. Durch Inhibierung der S1P-Lyase bricht der S1P-Gradient zusammen mit der Folge, dass eine Lymphopenie entsteht. Somit stellt die S1P-Lyase ein valides Target in der Entwicklung neuer, immunsupprimierender Substanzen dar (Schwab et al. 2005).

Die genetische Deletion der S1P-Lyase in der Maus (*Sgpl1*^{-/-}) führt innerhalb von 4-6 Wochen nach der Geburt zum Tod (Bektas et al. 2010). Gleichzeitig akkumulieren in diesen Mäusen S1P, Sphingosin und Ceramid (Bektas et al. 2010; Peest et al. 2008). Damit ähnelt der S1P-Lyase Knockout dem Erkrankungsbild einiger Sphingolipidosen, die eine Untergruppe der lysosomalen Speichererkrankungen bilden. Charakterisiert werden diese Erkrankungen durch eine Akkumulation verschiedener Sphingolipide innerhalb des Lysosoms aufgrund reduzierter Aktivität der Sphingolipid-metabolisierenden Enzyme (Eckhardt 2010). In der Folge akkumulieren in anderen Organellen wie dem ER oder den Mitochondrien ebenfalls Lipide, so dass die Eigenschaften dieser Organellen verändert werden. Die häufigsten Sphingolipidosen sind Morbus Gaucher, die durch einen Mangel an β -Glucosidase charakterisiert ist, die Niemann-Pick-Erkrankung, die durch einen Mangel an Sphingomyelinase bzw. einem Defekt im Gen *NPC1* und *NPC2* charakterisiert ist, sowie Morbus Fabry, die durch einen Mangel an α -Galactosidase charakterisiert ist. Ein Zusammenhang zwischen der Lipidakkumulation und einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase wurde bereits für Morbus Gaucher und Niemann-Pick Typ C1 nachgewiesen (Lloyd-Evans et al. 2003; Lloyd-Evans et al. 2008).

1.3. Sphingosinkinase-1

Es existieren zwei verschiedene humane Sphingosinkinasen (SKs), beide jeweils mit verschiedenen Spleißvarianten. SK1 und SK2 unterscheiden sich mit Molekulargewichten von 48 kDa (SK1a) und 65 kDa (SK2a) zwar stark in ihrer Größe, dennoch haben sie einen hohen Grad an Sequenzübereinstimmung. SK1b hat gegenüber der SK1a eine um 14 Aminosäuren längere N-terminale Sequenz. SK1c hat gegenüber der SK1a sogar einen um 86 Aminosäuren längeren N-Terminus (Pitson 2011). Die Sequenzidentität zwischen SK1 und SK2 beträgt ~40 % und die Sequenzhomologie annähernd 80 % (Liu et al. 2000). Beide SKs gehören zur Familie der Diacylglycerolkinasen und besitzen hochkonservierte Domänen, *conserved regions* C1-C5. Die Bindungsstelle der SK1 für ATP und Sphingosin ist in der C2-Domäne lokalisiert, die beiden Bindungsstellen für das Membranlipid Phosphatidylserin befinden sich N-terminal zwischen der C1- und der C2-Domäne und innerhalb der C2-Domäne. Die Phosphorylierungsstelle für die *extracellular signal-regulated kinase* ERK1/2 liegt an Serin 225 zwischen der C4- und der C5-Domäne, während sich die Bindungsstelle für TRAF2 (*TNF receptor-associated factor*) im C-Terminus befindet (Pitson et al. 2003; Alemany et al. 2007).

Die SK2 besitzt gegenüber der SK1 eine längere N-terminale Sequenz sowie eine zentrale Prolin-reiche Region zwischen C4 und C5. Zusätzlich unterscheiden sich beide SK-Isoformen in der Expression während der embryonalen Entwicklung, der Gewebeverteilung und der subzellulären Lokalisation. So ist die SK1 vorwiegend im Cytosol, die SK2 hingegen vorwiegend im Nucleus lokalisiert. Die SK2 kann nach Phosphorylierung durch die Proteinkinase D (PKD) aus dem Nucleus ins Cytoplasma exportiert werden (Ding et al. 2007).

Sowohl *SK1*^{-/-}- als auch *SK2*^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig, fertil und ohne auffälligen Phänotyp (Allende et al. 2004; Mizugishi et al. 2005). Dies deutet darauf hin, dass SK1 und SK2 zumindest in der Maus eine gewisse funktionelle Redundanz besitzen. Der SK1/SK2-Doppelknockout ist jedoch aufgrund massiv gestörter Neuro- und Angiogenese embryonal letal (Mizugishi et al. 2005). Während die Expression der SK1 zu einer vermehrten Proliferation und Migration führt und Apoptose inhibiert, wird der SK2 aufgrund ihrer zusätzlichen BH3-Domäne eine proapoptotische Rolle zugeschrieben (Hait et al. 2006; Liu et al. 2003).

Die SK1 wird durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli aktiviert, so bspw. durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs) wie den muskarinischen Acetylcholinrezeptor M₃R, den

purinergen Rezeptor P_2YR , den Bradykininrezeptor B_2R oder den Lysophosphatidsäurerezeptor LPA_2R , durch Rezeptortyrosinkinasen wie *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder *insulin-like growth factor* (IGF) und durch Zytokinrezeptoren für $TNF-\alpha$, TGF- β oder Interferon- γ (Alemany et al. 2007). Die Aktivierung der SK1 geht mit einer durch ERK1/2 vermittelten Phosphorylierung von Serin 225 einher (Lidington et al. 2009; Pitson et al. 2003). Gleichzeitig steigt die *in-vitro* gemessene katalytische Aktivität um den Faktor 14 an. Durch die Phosphorylierung wird gleichzeitig eine Translokation vom Cytosol an die Plasmamembran induziert. Dort bindet die SK1 mittels Threonin 54 und Asparagin 89 an Phosphatidylserin, einem Bestandteil der Innenseite der Plasmamembran (Stahelin et al. 2005). Auch wurde gezeigt, dass die SK1 mit Phosphatidsäure interagiert (Delon et al. 2004). Die SK1-Translokation ist nicht zwingend von der Phosphorylierung von Serin 225 abhängig. So konnte bereits gezeigt werden, dass die M_3R -vermittelte Translokation auch bei einer SK1-Mutante mit defekter Phosphorylierungsstelle (SK1 S225A) stattfindet (ter Braak et al. 2009). Nach der Translokation an die Plasmamembran wird vermehrt S1P exportiert, mit der Folge, dass der G_i -gekoppelte $S1P_1$ -Rezeptor agonisiert wird. Die Translokation der SK1 bewirkt somit eine Kopplung G_q -gekoppelter Signalwege an G_i -gekoppelte Signalwege (*receptor crosstalk*). Der genaue Mechanismus der SK1-Translokation ist allerdings noch unzureichend verstanden.

Es sind bereits verschiedene SK1-Protein-Interaktionen beschrieben worden. So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit TRAF2 für die Aktivierung von MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalwegen (ERK) und die anschließende Zytokinproduktion nach $TNF-\alpha$ -Stimulation von entscheidender Bedeutung ist (Alvarez et al. 2010; Xia et al. 2002). Ebenfalls beschrieben wurde eine Interaktion mit dem Membranankerprotein RPK-118 (Hayashi et al. 2002), dem Scaffoldingprotein *A-kinase anchor protein* (AKAP) (Lacana et al. 2002), dem Membranprotein *platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) (Fukuda et al. 2004), dem Aktin-bindenden Protein Filamin A (Maceyka et al. 2008) und dem mit Calmodulin verwandten Protein *Calcium- and Integrin-binding Protein 1* (CIB1) (Jarman et al. 2010). Allerdings ist die funktionelle Bedeutung dieser Interaktionen weitgehend unklar. Die Plasmamembranlokalisation der SK1 führt zu einer vermehrten S1P-Sekretion (Jarman et al. 2010; Pitson et al. 2003). Dies geschieht vornehmlich durch verschiedene Plasmamembrantransporter wie die *ATP-binding cassette* (ABC) Transporter ABCA1 (Sato et al. 2007), ABCC1 (Mittra et al. 2006) und ABCG2 (Takabe et al. 2010) sowie durch das transmembranäre Protein Spinster-2 (Spns2) (Kawahara et al. 2009).

Die S1P-Konzentration im Serum liegt im Bereich von 0,5 μM (Yatomi et al. 1997). Diese Konzentration liegt weit über den EC_{50} -Werten der S1P-Rezeptoren S1P_{1,2,3,5} von ~0.5-5 nM und des S1P₄-Rezeptors von ~100 nM (Mandala et al. 2002). Daher erscheint es plausibel, dass S1P im Blut an andere Proteine gebunden vorliegt. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass S1P an das Apolipoprotein ApoM bindet (Christoffersen et al. 2011).

1.4. Intrazelluläre Wirkung von S1P

Neben der Bindung an S1P-Rezeptoren besitzt S1P eine Reihe verschiedener intrazellulärer Wirkungen. So wurde gezeigt, dass durch Mikroinjektion von S1P oder durch Photolyse intrazellulär freigesetztes S1P (*caged* S1P) Ca^{2+} aus Thapsigargin-sensitiven Speichern unabhängig von S1P-Rezeptoren freigesetzt werden kann, wobei der genaue molekulare Mechanismus weiterhin ungeklärt ist (Meyer zu Heringdorf et al. 2003). Die Tatsache, dass in Hefen, die keine GPCRs exprimieren, dennoch die Sphingolipid-metabolisierenden Enzyme exprimiert werden, spricht ebenfalls für eine intrazelluläre Signalfunktion von S1P (Birchwood et al. 2001).

Im Zellkern inhibiert S1P Histondeacetylasen (HDACs). So wurde bereits gezeigt, dass die SK2 in definierten Promotorregionen an die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 bindet und dort S1P bildet. S1P inhibiert die HDACs mit der Folge, dass die Histone vermehrt acetyliert vorliegen und die Gentranskription verstärkt wird (Hait et al. 2009). Diese epigenetische Regulation hat großen Einfluss auf die Genexpression beispielsweise für das Gen p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) und das Gen c-fos (*transcriptional regulator*).

Desweiteren wurde bereits gezeigt, dass durch die SK2 an der inneren Mitochondrienmembran gebildetes S1P mit dem mitochondrialen Protein Prohibitin 2 (PHB2) interagiert und dass diese Interaktion eine wichtige Rolle im Aufbau der Cytochrom-c-Oxidase und damit der mitochondrialen Atmungskette spielt (Strub et al. 2011).

Durch die SK1 gebildetes S1P ist für die Funktion des TNF- α -Signalwegs essenziell (Alvarez et al. 2010). Bereits vorher war gezeigt worden, dass die SK1 mit TRAF2 interagiert (Xia et al. 2002). Die TRAF2-vermittelte SK1-Aktivierung ist für die TNF- α -induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κB notwendig. Alvarez et al. konnten den genauen Mechanismus aufklären. So ist die Bildung von S1P Voraussetzung für die TRAF2-vermittelte Polyubiquitylierung an Lysin 63 von RIP1 (*receptor-interacting protein 1*), das seinerseits als Plattform für die Rekrutierung und Aktivierung der I κB -Kinase dient. Daraufhin wird I κB abgebaut und NF κB aktiviert.

Durch Interaktion der Sphingosinkinasen mit spezifischen intrazellulären Effektorproteinen werden lokal hohe Konzentrationen an S1P erreicht. Aufgrund der Strukturunterschiede zwischen SK1 und SK2 ist eine jeweilige Interaktion mit unterschiedlichen Effektormolekülen möglich. So können die teils gegensätzlichen Effekte bspw. in Bezug auf die Apoptoseregulation trotz der Tatsache, dass beide Enzyme die gleiche enzymatische Reaktion katalysieren, erklärt werden.

1.5. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren und -Rezeptoragonisten

S1P sowie die Derivate Dihydro-S1P (Sphingalin-1-Phosphat) und Phyto-S1P (4-Hydroxysphingalin-1-Phosphat) binden an fünf verschiedene Rezeptoren, die S1P-Rezeptoren S1P_{1,2,3,4,5}, die mit Ausnahme des S1P₄-Rezeptors und des S1P₅-Rezeptors ubiquitär exprimiert werden. Der S1P₄-Rezeptor wird hauptsächlich in lymphatischen Geweben und der Lunge exprimiert, der S1P₅-Rezeptor vornehmlich im Gehirn und in der Haut. Der S1P₁-Rezeptor (*Edg1*) koppelt ausschließlich an G_{i/o}-Signalwege, der S1P₂-Rezeptor (*Edg5*) und der S1P₃-Rezeptor (*Edg3*) koppeln an G_{i/o}-, G_q- und G_{12/13}-Signalwege, der S1P₄-Rezeptor (*Edg6*) und der S1P₅-Rezeptor (*Edg8*) koppeln an G_{i/o}- und G_{12/13}-Signalwege (Chun et al. 2010; Meyer zu Heringdorf und Jakobs 2007).

Der S1P₁-Rezeptor ist insbesondere bei der Gefäßneubildung während der embryonalen Entwicklung von Bedeutung. Das genetische Ausschalten des S1P₁-Rezeptors ist aufgrund von Hämorrhagien embryonal letal (nach Embryonaltag 12.5 bis 14.5), da der Rezeptor die Ausbildung von *tight junctions* zwischen Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen reguliert. Zusätzlich wird der S1P₁-Rezeptor auf Lymphozyten und anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert und reguliert dort die Auswanderung ins Blut.

Der S1P₂-Rezeptor induziert Zellproliferation und hemmt die Migration, da er am effektivsten an G_{12/13}-Signalwege koppelt und die kleine GTPase Rho aktiviert (Skoura und Hla 2009a). Studien an S1P₂-Rezeptor-knockout Mäusen zeigten, dass der Rezeptor eine wichtige Rolle im Gehör spielt. So sind diese Mäuse aufgrund einer gestörten Innenohrvaskularisierung taub und haben Gleichgewichtsstörungen (Kono et al. 2007). Mutation des Zebrafischhomologs *miles apart* (Mil) führt zu einer fehlregulierten Einwanderung von Kardiomyocytenvorläuferzellen mit der Folge einer *Cardia bifida* (Kupperman et al. 2000). Ein ähnliches Bild ergibt sich im Zebrafischmodell durch Knockout des S1P-Transporters Spns-2 (Kawahara et al. 2009).

Der S1P₃-Rezeptor koppelt am effektivsten an G_q-Signalwege und wird unter anderem auf Herzmuskelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Aktivierung des S1P₃-Rezeptors führt zu einer arteriellen Vasokontraktion (Salomone et al. 2008). Das Ausschalten des S1P₃-Rezeptors zeigt in der Maus keinen offensichtlichen Phänotyp, während das Ausschalten der S1P_{2,3}-Rezeptoren zu einer reduzierten Fertilität führt (Ishii et al. 2002).

Der S1P₄-Rezeptor inhibiert sowohl die Proliferation als auch die Sekretion von Zytokinen in Immunzellen (Golfier et al. 2010; Wang et al. 2005). Der S1P₅-Rezeptor ist für die Auswanderung von NK-Zellen wichtig (Jenne et al. 2009).

S1P₁-Rezeptoragonisten wie das zur Behandlung der MS eingesetzte FTY720 führen zu einer Lymphopenie (Brinkmann 2009). FTY720 stellt ein klassisches Prodrug dar, das erst nach intrazellulärer Phosphorylierung durch die SK2 und Export S1P-Rezeptoren agonisiert. Für FTY720-Phosphat konnte wie auch für S1P gezeigt werden, dass es durch Spns2 exportiert wird (Hisano et al. 2011).

Das strukturell mit Sphingosin verwandte cis-4-Methylsphingosin wird durch beide Sphingosinkinasen zum aktiven Metaboliten cis-4-Methylsphingosin-1-phosphat phosphoryliert und führt zu einer Internalisierung der S1P_{1,3}-Rezeptoren. Somit unterscheidet sich cis-4-Methylsphingosin-1-Phosphat von FTY720-Phosphat durch die zusätzliche Agonisierung des S1P₂-Rezeptors (ter Braak et al. 2011).

1.6. G_q-Signalwege

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind heptahelikale Membranproteine, die verschiedene extrazelluläre Signale ins Zellinnere übertragen. Die Klasse der GPCRs ist heterogen und umfasst Rezeptoren für unterschiedliche Signale wie Licht, Peptide, Hormone oder Neurotransmitter (Rosenbaum et al. 2009). Auf Basis ihrer Sequenz und strukturellen Ähnlichkeit werden die GPCRs in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt: in Rhodopsin-, Sekretin-, Glutamat-, Adhäsions- und *Frizzled/Taste 2*-Gruppe (Fredriksson et al. 2003). Neben dieser funktionellen Klassifizierung existiert auch eine Einteilung nach der Art der Signalweiterleitung in G_{i/o}-, G_s-, G_{q/11}- und G_{12/13}-gekoppelte Rezeptoren (Wettschureck und Offermanns 2005). Im Folgenden wird näher auf den Aktivierungszyklus G_{q/11}-gekoppelter Rezeptoren eingegangen.

Nach Aktivierung der Rezeptoren und GDP/GTP-Austausch durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*; GEFs) an der G α -Untereinheit, dissoziiert die G $\beta\gamma$ -Untereinheit ab. Die aktivierte G α -Untereinheit aktiviert ihrerseits

wiederum den klassischen Effektor Phospholipase C (PLC), insbesondere die Isoformen PLC $\beta_{1/3/4}$ (Rhee 2001). Diese spaltet membranäres Phosphoinositolbisphosphat (PIP $_2$) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP $_3$). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), IP $_3$ führt zu einer Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus dem ER. Neben der aktivierten G α -Untereinheit spielt auch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit eine Rolle bei der Aktivierung der PLC β (Rhee 2001). Weitere Effektoren der G $\beta\gamma$ -Untereinheit sind Ionenkanäle sowie die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (Lodowski et al. 2005; Smrcka 2008).

Die GEFs katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und beschleunigen somit die Aktivierung der G α -Untereinheit. Zu dieser Proteinklasse gehören u.a. die GPCRs und Proteine, die spezifisch kleine G-Proteine wie Rho, Rac und Cdc42 aktivieren. Durch die Interaktion der aktivierten G α -Untereinheit mit p63RhoGEF wird bspw. Rho aktiviert (Rojas et al. 2007).

Die GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit wird durch die Interaktion mit der PLC β gesteigert. In der Folge wird die G α -Untereinheit durch Hydrolyse des gebundenen GTP inaktiviert, so dass die G α -Untereinheit und die G $\beta\gamma$ -Untereinheit reassoziieren können.

Die Geschwindigkeit der Inaktivierung der G α -Untereinheit kann durch Interaktion mit GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) erhöht werden, zu denen z.B. die *regulator of G-protein signalling* (RGS)-Proteine gehören. Bisher wurden bereits mehr als 30 verschiedene RGS-Proteine identifiziert, die alle eine RGS-Homologie (RH)-Domäne von ca. 130 Aminosäuren und eine unterschiedlich starke Affinität zu verschiedenen G α -Untereinheiten aufweisen (Sethakorn et al. 2010). Homologe Domänen wurden auch in anderen Proteinen nachgewiesen, bspw. in den RhoGEFs und den G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) (Aittaleb et al. 2010; Lodowski et al. 2005).

Es existieren eine Reihe verschiedener Mechanismen, um den Rezeptor wieder abzuschalten. So ist die Serin/Threoninkinase GRK2 nach Rekrutierung an die Plasmamembran in der Lage, mit ihrer RH-Domäne an aktiviertes G α_q zu binden, um die G $_q$ -PLC β -Interaktion durch Kompetition zu inhibieren. Für die Interaktion zwischen G α -Untereinheit und GRK2 ist das Vorhandensein des Prolinrestes 185 in der *Switch I*-Region von G α_q von entscheidender Bedeutung (Day et al. 2004). Daneben führt die Kinaseaktivität der GRK2 zu einer Phosphorylierung des GPCRs mit der Folge, dass β -Arrestin rekrutiert und der Rezeptor internalisiert wird (Huang und Tesmer 2011). Zusätzlich interagiert der C-Terminus von GRK2 mit der G $\beta\gamma$ -Untereinheit, so dass auch die Aktivierung dieser Effektoren inhibiert wird (Pitcher et al. 1992).

Die genaue Kristallstruktur des gesamten $G\alpha_q$ -GRK2- $G\beta\gamma$ Komplexes wurde bereits aufgeklärt (Tesmer et al. 2005). Sie zeigt, dass $G\alpha_q$ eine Effektor-ähnliche Interaktion mit der RH-Domäne von GRK2 eingeht. Gleichzeitig kann $G\alpha_q$ mit der RH-Domäne von RGS-Proteinen wie bspw. RGS4 interagieren (Shankaranarayanan et al. 2008).

Die konstitutive Aktivierung von $G\alpha_q$ wird in einem hohen Prozentsatz (50-83 %) bei bestimmten Melanomformen nachgewiesen. Die permanente Aktivierung der PLC β führt zu einer gesteigerten Proliferation der Melanocyten (Van Raamsdonk et al. 2009). Gleichzeitig induziert die konstitutive Aktivierung von $G\alpha_q$ eine permanente Membranlokalisation der SK1 (ter Braak et al. 2009). Ein Zusammenhang zwischen der konstitutiven Aktivierung von $G\alpha_q$ und der Aktivierung der SK1 mit der Folge, dass Proliferation und Migration gesteigert werden, ist in diesen Melanomen sehr wahrscheinlich.

1.7. Fragestellung

Wie oben beschrieben, stellt das S1P-Signalsystem eine vielversprechende Zielstruktur für neue Arzneimittel dar. Das generelle Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion des S1P-Signalsystems weiter aufzuklären, wobei die Schwerpunkte der Fragestellung die Bildung sowie die Wirkungen von S1P betrafen. Hierzu sollten drei Teilaspekte näher untersucht werden:

Der erste Teil der Arbeit geht der Frage nach, welche Störungen das Ausschalten der S1P-Lyase in der Ca^{2+} -Homöostase verursacht. Vorarbeiten hatten nahegelegt, dass in embryonalen Fibroblasten (MEFs) aus S1P-Lyase-defizienten Mäusen (*Sgpl1*^{-/-}) die Ca^{2+} -Homöostase gestört sein könnte (ter Braak 2009). So hatten Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2 an *Sgpl1*^{-/-}-MEFs in Suspension eine erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ und eine verstärkte Mobilisierung von Ca^{2+} nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten oder mit Thapsigargin gezeigt. Bei Messungen an Zellsuspensionen ist es jedoch möglich, dass einige wenige Zellen mit stark erhöhter $[Ca^{2+}]_i$, beispielsweise apoptotische Zellen, eine allgemein erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ vortäuschen. Deshalb war es wichtig, die $[Ca^{2+}]_i$ in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs auf Einzelzellebene zu messen. Weitere Vorarbeiten hatten außerdem gezeigt, dass Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluo-4 in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs stark kompartmentalisiert werden, weshalb sie für die geplanten Einzelzellmessungen unbrauchbar waren. Die Aufgabe war es also, einen geeigneten Ca^{2+} -Sensor für Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ an einzelnen *Sgpl1*^{-/-}-MEFs zu identifizieren und die vermutete Störung der Ca^{2+} -Homöostase näher zu charakterisieren.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Aspekte der Modulation des S1P-Signalsystems durch das Sphingosin-Analogon cis-4-Methylsphingosin näher untersucht werden. Es war gezeigt worden, dass cis-4-Methylsphingosin intrazellulär zu cis-4-Methyl-S1P phosphoryliert werden kann (van Echten-Deckert et al. 1998). Dabei war lange vermutet worden, dass sowohl cis-4-Methylsphingosin als auch cis-4-Methyl-S1P ausschließlich intrazellulär wirken (van Echten-Deckert et al. 1997). Vorarbeiten zu dieser Promotionsarbeit hatten dagegen erstmals nahegelegt, dass cis-4-Methyl-S1P extrazellulär wirken könnte, indem es S1P-Rezeptoren moduliert (ter Braak 2008). So wurden nach Inkubation der Zellen mit cis-4-Methylsphingosin die S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂ und S1P₃ internalisiert und S1P-induzierte [Ca²⁺]_i-Anstiege desensibilisiert. Eine wichtige offene Frage war hierbei jedoch, ob cis-4-Methyl-S1P überhaupt von Zellen, welche mit cis-4-Methylsphingosin inkubiert werden, sezerniert werden kann und im Zellüberstand zu finden ist. Deshalb sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Verteilung von cis-4-Methylsphingosin und cis-4-Methyl-S1P in Zellen und Zellüberständen quantifiziert werden.

Der dritte und umfangreichste Teil der Arbeit befasst sich mit der Regulation der SK1 durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Zu Beginn der Promotion war bekannt, dass die SK1 nach Aktivierung G_q-gekoppelter Rezeptoren wie dem M₃-Muskarinrezeptor oder dem B₂-Bradykininrezeptor an die Plasmamembran transloziert, aber nicht nach Stimulation des hauptsächlich G_i-gekoppelten M₂-Muskarinrezeptors oder des ausschließlich an G_i-gekoppelten S1P₁-Rezeptors (ter Braak et al. 2009). Außerdem war gezeigt worden, dass die Überexpression von konstitutiv aktivem Gα_q und dem nahe verwandten Gα₁₁, aber nicht von konstitutiv aktivem Gα_i, Gα₁₂ oder Gα₁₃, eine dauerhafte Lokalisation der SK1 an der Plasmamembran bewirkte (ter Braak et al. 2009). Eine Analyse der beteiligten Signalwege zeigte, dass die SK1-Translokation durch G_q-gekoppelte Rezeptoren nicht durch die klassischen G_q-Signalwege wie Diacylglycerolbildung, Aktivierung von klassischen PKCs, [Ca²⁺]_i-Anstieg oder Ca²⁺/Calmodulin vermittelt wurde. Außerdem waren weder die Phospholipase D noch eine Phosphorylierung der SK1 an Serin 225 an der G_q-vermittelten SK1-Translokation beteiligt (ter Braak et al. 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von Gα_{q/11}-Proteinen bei der Ansteuerung der SK1 durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weiter untersucht werden. Dazu sollte zunächst die Rezeptor-induzierte Translokation der SK1 in Gα_q und Gα₁₁ doppelt defizienten MEFs untersucht werden, und es sollten durch Transfektion von Gα_q-Mutanten in die doppelt defizienten MEFs Hinweise auf die strukturellen Erfordernisse für die SK1-Ansteuerung durch Gα_q erhalten werden. Als nächstes sollte untersucht werden, ob Gα_q und SK1 eventuell direkt miteinander interagieren,

da schließlich bis jetzt keine weiteren beteiligten Signalkomponenten identifiziert werden konnten. Hierfür sollte zunächst durch Messung der PLC-Aktivität und durch Überexpression einer katalytisch inaktiven GRK2-Mutante als $G\alpha_q$ -*scavenger* untersucht werden, ob SK1 und PLC β um $G\alpha_q$ konkurrieren. Außerdem sollte die SK1 in Bakterien exprimiert und gereinigt werden und eine mögliche Interaktion mit $G\alpha_q$ mittels optischer Thermophorese untersucht werden. Insgesamt sollte die Hypothese überprüft werden, dass die SK1 ein direkter Effektor von $G\alpha_q$ sein könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|--|------------------------------|
| Acrylamid Rotiphorese Gel 30 | Roth, Karlsruhe |
| Agarose | AppliChem, Darmstadt |
| Aluminiumchlorid Hexahydrat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ameisensäure | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Aprotinin | Roche, Mannheim |
| BAPTA/AM | Enzo Life Sciences, Lörrach |
| Bromphenolblau | AppliChem, Darmstadt |
| BSA | PAA, Pasching, AT |
| BSA (Fettsäure-frei) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 1-Butanol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Calciumchlorid Dihydrat | Roth, Karlsruhe |
| Carbamoylcholinchlorid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Chloroform | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| DMSO | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Digitonin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Roth, Karlsruhe |
| EDTA Natriumsalz | AppliChem, Darmstadt |
| EGTA Natriumsalz | AppliChem, Darmstadt |
| Essigsäure | J. T. Baker, Griesheim |
| Fura-2/AM | Life Technologies, Darmstadt |
| GelRed | Biotium, Hayward, USA |
| D-Glucose Monohydrat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Glycerol | Roth, Karlsruhe |
| β -Glycerolphosphat Calciumsalz Hydrat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |

| | |
|--|------------------------------|
| Hefeextrakt | AppliChem, Darmstadt |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Imidazol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Kaliumacetat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Kaliumchlorid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Roth, Karlsruhe |
| Kanamycinsulfat | Roth, Karlsruhe |
| Leupeptin | Roche, Mannheim |
| Magermilchpulver Sucofin | TSI, Zeven |
| Magnesiumacetat Tetrahydrat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat | Merck, Darmstadt |
| D(+)-Maltose | Roth, Karlsruhe |
| Mangan (II) chlorid Tetrahydrat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| β -Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 4-Morphelinethansulfonsäure Hemi-Natriumsalz | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| MOPS | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumdiphosphat | Alfa Aeser, Karlsruhe |
| Natriumfluorid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumhydrogencarbonat | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumhydroxid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriummonophosphat Dihydrat | Riedel-de Haën, Seelze |
| Natriumorthovanadat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Nickel (II) chlorid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Paraformaldehyd | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Pefablock | Roche, Mannheim |
| Pepton aus Casein (tryptisch verdaut) | Roth, Karlsruhe |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Roth, Karlsruhe |
| Poly-L-Lysinhydrobromid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Premo Cameleon Calciumsensor | Life Technologies, Darmstadt |
| Premo Enhancer | Life Technologies, Darmstadt |
| Proteaseinhibitor-Mix (PIM) | Roche, Mannheim |

| | |
|--|------------------------------|
| Rubidiumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | MP Biomedicals, Illkirch, F |
| Select Agar | Life Technologies, Darmstadt |
| Sphingosinkinase-Inhibitor-II (SKI-II) | Merck, Darmstadt |
| TEMED | MP Biomedicals, Illkirch, F |
| Thapsigargin | Merck, Darmstadt |
| Tris Base | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tris Hydrochlorid | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Roth, Karlsruhe |
| Tween-20 | Sigma-Aldrich, Steinheim |

2.1.2. Zelllinien

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|---|---|
| M ₃ -Rezeptor-exprimierende HEK-293-Zellen | ursprünglich generiert von Ernest G. Peralta, UC San Francisco, USA (Peralta et al. 1987) |
| <i>Sgpl1</i> ^{+/+} -MEFs / <i>Sgpl1</i> ^{-/-} -MEFs | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Paul van Veldhoven, K. U. Leuven, Belgien |
| <i>Gαq11</i> ^{+/+} -MEFs / <i>Gαq11</i> ^{-/-} -MEFs | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stefan Offermanns, MPI, Bad Nauheim |

2.1.3. Medien und Zusätze

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|---------------------------|------------------------------|
| DMEM/F12 | Life Technologies, Darmstadt |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Biochrom, Berlin |
| Penicillin/Streptomycin | Life Technologies, Darmstadt |
| Geneticin | Merck, Darmstadt |
| Trypsin | Life Technologies, Darmstadt |

2.1.4. Erstantikörper

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|--|---|
| Anti-HA (Maus; Klon 12C05) | Roche, Mannheim |
| Anti-SK1 (human) (Kaninchen; polyklonal) | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Andrea Huwiler, Bern und Josef M. Pfeilschifter, Frankfurt am Main |
| Anti-β-Aktin I-19 (Ziege; SC1616) | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |

2.1.5. Zweitantikörper

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|--|--------------------------------------|
| Alexa Fluor-555 Ziege Anti-Maus SFX-Kit | Life Technologies, Darmstadt |
| Amersham Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (NA934V) | GE Healthcare, Freiburg |
| Anti-Ziege-IgG-Peroxidase-Konjugat (SC2020) | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |

2.1.6. Restriktionsenzyme

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Erkennungssequenz</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|--------------------|--------------------------|--|
| <i>Bam</i> HI | 5' G↓GATCC 3' | Fermentas, St. Leon-Rot |
| <i>Ssp</i> I | 5' AAT↓ATT 3' | New England Biolabs, Frankfurt am Main |
| <i>Xba</i> I | 5' T↓CTAGA 3' | Fermentas, St. Leon-Rot |

2.1.7. Vektoren

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|--------------------|--|
| YFP-mSK1 | Kerstin Danneberg, Essen |
| GFP-hSK1 | Nicholas Ktistakis, Cambridge, UK / Stuart Pitson, Adelaide, AUS |
| hSK1-Cerulean | synthetische Sequenz von Mr. Gene, Regensburg; umkloniert in pcDNA3.1-Vektor |
| GRK2-kd | Thomas Wieland, Mannheim |

| | |
|-------------------------------|---|
| pcDNA3.1 | Invitrogen, Darmstadt |
| GFP (pEGFP-C2) | Clontech, Heidelberg |
| SK1-G82D | Stuart Pitson, Adelaide, AUS |
| B ₂ -Rezeptor | Andrée Blaukat, Darmstadt |
| G α_q -wt | Thomas Wieland, Mannheim |
| G α_q -YFP | Catherine Berlot, Danville, PA, USA / Moritz Bünemann, Marburg |
| G α_q -T257E | Thomas Wieland, Mannheim |
| G α_q -Y261N | Thomas Wieland, Mannheim |
| G α_q -W263D | Thomas Wieland, Mannheim |
| G α_q -D321A | Thomas Wieland, Mannheim |
| G α_q -Y356K | Thomas Wieland, Mannheim |
| HA-S1P ₁ -Rezeptor | UMR cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA |
| G α_i -YFP | Moritz Bünemann, Marburg |
| G α_{i5q} -G66D | Evi Kostenis, Bonn |
| pMCSG9 | Thomas Wieland, Mannheim |

2.1.8. E.coli Stämme

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|--------------------|---|
| E.coli XL-1 blue* | Stratagene, Heidelberg |
| E.coli Rosetta | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Wieland und Karola Wittig, Mannheim |

* Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq Z Δ M15 Tn10 (Tetr)] E.coli

2.1.9. Primer (MWG Operon)

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Sequenz</u> |
|--------------------|--|
| hSK1-pMCSG9-fw | 5' TAC TTC CAA TCC AAT GCC ATG GAT CCA GCG GGC GGC CCC 3' |
| hSK1-pMCSG9-rev | 5' TTA TCC ACT TCC AAT GTC ATA AGG GCT CTT CTG GCG GTG G 3' |

2.1.10. rekombinante Proteine

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|-----------------------------------|--|
| G α_q 7-359 (NP_032165) | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von John Tesmer, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA |
| TANK (PRO-685) | Prospec Bio, Rehovot, Israel |
| TRAF2 1-502 (AAH43492; H00007186) | Abnova, Heidelberg |

2.1.11. Radiochemikalien

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|--|------------------------------------|
| Myo-2-[^3H]-Inositol; 23.75 Ci/mmol | Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim |

2.1.12. Häufig verwendete Pufferlösungen

2.1.12.1. Proteinbestimmung

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|--------------------|---|
| Lysepuffer | 50 mM Tris HCl pH 7,4 150 mM NaCl 10 % Glycerol 2 mM EDTA 2 mM EGTA 50 mM NaF 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O 2 mM DTT 200 µM Na ₃ VO ₄ 1 % Triton X-100 40 mM β-Glycerolphosphat |
| Proteinlysepuffer | Lysepuffer 1 ml PIM 40 µg/ml PMSF 10 µg/ml |

2.1.12.2. Calciummessung

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|--------------------|--|
| HBSS | 118 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5 mM Glucose 15 mM HEPES pH 7,4 |

2.1.12.3. Agarosegel

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|--------------------|---|
| 50x TAE-Puffer | 1 M Tris Base 500 mM CH ₃ COOH 50 mM Na ₂ EDTA·2 H ₂ O |
| 1,5 % Agarosegel | 2,25 g Agarose 7,5 µl GelRed Nucleic Acid Stain 150 ml 1x TAE-Puffer |

2.1.12.4. Nährmedien für Bakterien

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|--------------------|---|
| LB-Medium | 10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar (ggf. für Agarplatten) H ₂ O ad 1 l; autoklaviert |
| 2x YT-Medium | 16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl H ₂ O ad 1 l; autoklaviert |

2.1.12.5. Medien zur Herstellung kompetenter Bakterien

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|--------------------|--|
| TFB I-Puffer | 30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerol pH 5,8; steril |

| | |
|---------------|-------------------------|
| TFB II-Puffer | 10 mM MOPS |
| | 10 mM RbCl |
| | 75 mM CaCl ₂ |
| | 15 % Glycerol |
| | pH 7,0; steril |

2.1.12.6. Proteinaufreinigung

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|---------------------------|---|
| Equilibrierungspuffer (1) | 10 mM Tris HCl pH 7,2 5 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Aprotinin 100 µg/ml Pefablock EDTA 1 mM/ml |
| Waschpuffer (2) | 10 mM Tris HCl pH 7,2 1 M NaCl 5 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Aprotinin 100 µg/ml Pefablock |
| Elutionspuffer (3) | 10 mM Tris HCl pH 7,2 10 mM Maltose 5 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Aprotinin 100 µg/ml Pefablock |

| | |
|---------------------------|---|
| Equilibrierungspuffer (A) | 50 mM Tris HCl pH 8,0 100 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 20 % Glycerol 5 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Aprotinin 100 µg/ml Pefablock 6 mM β-Mercaptoethanol |
| Waschpuffer (B) | 50 mM Tris HCl pH 8,0 100 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 20 % Glycerol 5 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Aprotinin 100 µg/ml Pefablock 6 mM β-Mercaptoethanol 25 mM Imidazol |
| Elutionspuffer (C) | 50 mM Tris HCl pH 8,0 100 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 20 % Glycerol 5 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Aprotinin 100 µg/ml Pefablock 6 mM β-Mercaptoethanol 400 mM Imidazol |

2.1.12.7. Sphingosinkinase-1-Aktivitätsassay

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|--------------------|--|
| 2x SK1-Assaypuffer | 100 mM Tris/HCl pH 7,2 20 % Glycerol 2 mM β -Mercaptoethanol 2 mg/ml BSA (Fettsäure-frei) 10 μ g/ml Leupeptin 4 μ g/ml Aprotinin 2 mM PMSF |

2.1.12.8. Western Blot

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|---------------------------|---|
| 10 %iges Trenngel (1 Gel) | 3,3 ml Acrylamid 2,5 ml lower Tris 3,9 ml H ₂ O 100 μ l 10 % SDS 100 μ l APS 4 μ l TEMED |
| Sammelgel (1 Gel) | 0,49 ml Acrylamid 2,00 ml upper Tris 0,36 ml H ₂ O 30 μ l 10 % SDS 29 μ l APS 2,9 μ l TEMED |
| 4x Laemmli-Puffer | 40 % Glycerol 10 % SDS 125 mM Tris-HCl pH 6,8 50 mM Dithiothreitol 0,01 % Bromphenolblau |

| | |
|-------------------------------|---|
| Trenngel-Puffer (lower Tris) | 1,5 M Tris HCl pH 8,8 |
| Sammelgel-Puffer (upper Tris) | 0,5 M Tris HCl pH 6,8 |
| Elektrodenpuffer (10x PAGE) | 0,25 M Tris Base 2 M Glycin 1 % SDS |
| Transfer-Puffer nach Towbin | 25 mM Tris Base 200 mM Glycin pH 8,3 20 % Methanol |
| PBS | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ |
| PBST | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ 0,1 % Tween-20 (w/v) |
| Blocking-Puffer | PBS 5 % Magermilchpulver |
| Inkubationspuffer | PBS 0,5 % Magermilchpulver |

2.1.12.9. Thermophorese

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|--------------------------------|---|
| Gα _q -Proteinpuffer | 100 mM NaCl 20 mM Hepes pH 7,0 1 mM Dithiothreitol 10 μM GDP 1 mM MgCl ₂ |
| SK1-Proteinpuffer | 50 mM Tris HCl pH 8,0 150 mM NaCl |

2.1.13. Geräte

| <u>Gerät</u> | <u>Hersteller</u> |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| SpectraMax M5e | Molecular Devices, Ismaning |
| F-2500 Fluoreszenzspektrometer | Hitachi, Mannheim |
| LSM 510 META Laserscanningmikroskop | Carl Zeiss, Jena |
| Monolith NT.015T | Nanotemper, München |
| Western Blot Geräte | Bio-Rad Laboratories, München |
| Nanodrop 1000 | Thermo Scientific, Wilmington, USA |
| Safe 2020 | Thermo Scientific, Wilmington, USA |

2.1.14. Kits

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Hersteller/Lieferant</u> |
|--------------------------------|-----------------------------|
| peqGOLD Gel Extraction Kit | Peqlab, Erlangen |
| peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I | Peqlab, Erlangen |
| EndoFree Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| EndoFree Plasmid Mega Kit | Qiagen, Hilden |

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert und alle verwendeten Materialien autoklaviert.

Alle verwendeten MEFs wurden in DMEM/F12-Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin G und 0,1 mg/ml Streptomycin in Gegenwart von 5 % CO₂ bei 37 °C in feuchter Atmosphäre kultiviert. HEK-293-Zellen, die stabil den muskarinischen Acetylcholinrezeptor vom Subtyp M₃ überexprimieren, wurden in DMEM/F12-Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin G, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,5 mg/ml Geneticin (G418) kultiviert.

Vor den Experimenten wurde das jeweilige Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, und für 16 Stunden serumfreies Medium mit Penicillin G und Streptomycin zugegeben.

2.2.2. Cameleon Calciumsensor

Für die quantitative Calciummessung an Einzelzellen wurde der Cameleon Ca²⁺-Sensor verwendet. Der Cameleon Ca²⁺-Sensor ist ein neuartiges, Ca²⁺-sensitives fluoreszierendes Protein. Die codierende DNA wird mittels BacMam-Technologie in die Zellen geschleust. Cameleon beinhaltet zwei fluoreszierende Proteine (*enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP) und Venus, eine leuchtstärkere EYFP-Variante, die über Calmodulin bzw. über das Ca²⁺-Calmodulin-bindende Protein M13-Myosinleichtkettenkinase fusioniert wurden (Evanko und Haydon 2005). Nach Bindung von vier Ca²⁺-Ionen verändert Calmodulin seine Konformation und windet sich um das M13-Protein. Dies führt zu einer Veränderung der Distanz zwischen ECFP und Venus und damit zu einer Veränderung der Effizienz des FRET-Effektes (*fluorescence resonance energy transfer*) zwischen ECFP-Donor und Venus-Akzeptor (Chudakov et al. 2010). Eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt zu einer Verstärkung des FRET-Effekts, d.h. zu einer Abnahme der Fluoreszenz von ECFP bei 485 nm und zu einer Zunahme der Fluoreszenz von Venus bei 535 nm. Zur Auswertung wird das Emissionsverhältnis von Venus zu ECFP bei gleich bleibender Exzitationsstärke gebildet. Die Dissoziationskonstante von Cameleon liegt bei 250 nM (Nagai et al. 2004) und ist daher mit der von Fura-2 (224 nM) vergleichbar (Grynkiewicz et al. 1985).

Die MEFs wurden trypsinisiert, gewaschen, die Zellzahl auf 40000 (*Sgpl1^{+/+}*) bzw. 60000 (*Sgpl1^{-/-}*) Zellen pro ml eingestellt und jeweils 8000 (*Sgpl1^{+/+}*) bzw. 12000 (*Sgpl1^{-/-}*) Zellen in jede Kammer eines 8-wells (Ibidi) gegeben. Am folgenden Tag wurde Cameleon-Transduktionsreagenz entsprechend den Vorgaben des Herstellers in DPBS verdünnt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und Premo-Enhancerlösung in serumfreiem Medium ebenfalls für 90 Minuten bei 37 °C; 5 % CO₂ auf die Zellen gegeben. Danach wurde die Enhancerlösung abgenommen und durch serumhaltiges Medium ersetzt.

[Ca²⁺]_i-Messungen wurden einen Tag nach der Transduktion mittels eines konfokalen Laserscanningmikroskops (Zeiss LSM510 META) durchgeführt. Dabei wurde ein Plan-Neofluar 40x/1.30 Ölimmersionsobjektiv verwendet. Der FRET zwischen dem blau fluoreszierenden Protein ECFP und dem gelb fluoreszierenden Protein Venus wurde bei einer Exzitation von 405 nm und mit Bandpass (BP)-Emissionsfiltern (465 - 510 nm und 530 - 600 nm) gemessen. Die Empfindlichkeit der Photomultiplier war in beiden Kanälen gleich hoch eingestellt. Fluoreszenz-Zeit-Verläufe wurden durch das Mitteln cytosolischer Regionen, der *regions of interests* (ROIs), einzelner Zellen erstellt. Die [Ca²⁺]_i wird als Verhältnis aus der Emission bei 530 - 600 nm und der Emission bei 465 - 510 nm angegeben.

2.2.3. Lipidextraktion

Für die Lipidextraktion wurden Zellen auf einer 6-well Platte oder auf 35-mm Schälchen ausgesät und bis 90 % Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden über Nacht mit der jeweiligen Substanz stimuliert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen, auf Eis 1000 µl Methanol mit internem Standard (D-erythro-C17-Ceramid 5 ng/ml; D-erythro-C17-Sphingosin 20 ng/ml; D-erythro-C17-S1P 20 ng/ml) und 35 µl 1 M Salzsäure zu den Zellen gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 4 °C wurden die Zellysate abgekratzt und in ein Glasröhrchen überführt. Anschließend wurde jedes Well mit 1,2 ml Methanol gewaschen und beide Methanolphasen vereinigt. Danach wurden 1,6 ml Salzlösung (0,74 % KCl, 0,04 % CaCl₂, 0,034 % MgCl₂) und 2,0 ml Chloroform zugegeben, gevortext und bei 600 rpm 10 Minuten (Thermo Scientific Heraeus Multifuge 1S) zentrifugiert. Die untere Chloroformphase wurde in ein Glaszentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgten zwei weitere Extraktionsschritte mit 2,0 ml bzw. mit 1,0 ml Chloroform. Die vereinigten Chloroformphasen wurden am Rotationsverdampfer eingengt. Die Lipide wurden in 200 µl

DMSO mit 2 % Salzsäure rückgelöst, in ein MS-Glasgefäß mit Einsatz überführt und mittels Tandem-MS bestimmt (Schmidt et al. 2006; ter Braak et al. 2011).

Für die Proteinbestimmung wurden 500 µl Protein-Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben und die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford bestimmt.

Zur Bestimmung der Lipide in Überständen wurden die Überstände gesammelt, zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert und in Glasröhrchen überführt. 1000 µl Methanol mit internem Standard, 140 µl 1 M HCl und 400 µl 10x Salzlösung (7.4 % KCl, 0.4 % CaCl₂, 0.34 % MgCl₂) wurden zugegeben. Die Lipide wurden nach dreimaliger Extraktion mit Chloroform und Verdampfen der vereinigten Chloroformphase ebenfalls in 200 µl DMSO mit 2 % Salzsäure rückgelöst, in ein MS-Glasgefäß mit Einsatz überführt und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Pharmakologie mittels Tandem-MS wie folgt bestimmt.

Zur Detektion wurde ein Quadrupol-Massenspektrometer 4000 Q TRAP mit einer Turbo V Ionensprühquelle und linearer Ionenfalle (Applied Biosystems) verwendet. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mittels HPLC (C18(2) *reversed phase*-Säule mit 150 mm Länge und 100 Å Porengröße). Jeweils 10 µl der extrahierten Proben wurden injiziert. Die mobile Phase bestand aus einem Eluenten A (0.1 % Ameisensäure) und einem Eluenten B (0.1 % Ameisensäure in Acetonitril/Tetrahydrofuran 50/50). Die Flussrate lag bei 0.3 ml/min, das Verhältnis A:B war während der ersten 36 Sekunden konstant bei 57.5:42.5 und wurde anschließend innerhalb von 264 Sekunden linear auf 0:100 erhöht und für weitere 300 Sekunden beibehalten. Anschließend wurde das Verhältnis A:B innerhalb von 30 Sekunden linear auf 57.5:42.5 verringert und bis zum Ende nach insgesamt 14 Minuten konstant gehalten.

Sphingosin, S1P, cis-4M-Sphingosin und cis-4M-S1P wurden nach jeweils 6.33 ± 0.03 min (n = 29), 6.91 ± 0.02 min (n = 29), 6.38 ± 0.05 min (n = 12) und 6.92 ± 0.02 min (n = 9), eluiert (Mittelwerte \pm SD).

Die Auswertung erfolgte mit Analyst 1.5 (Applied Biosystems). Die zum jeweiligen Analyten zählende Fläche unter der Kurve (*analyte peak area counts*) wurde in das Verhältnis zum internen Standard gesetzt und anhand des externen Standards die enthaltene Konzentration bestimmt. Die Konzentrationen von Sphingosin sowie cis-4M-Sphingosin wurden auf die Konzentration von C17-Sphingosin normalisiert, und S1P sowie cis-4M-S1P wurden auf die Konzentration von C17-S1P normalisiert.

2.2.4. PCR-Klonierung der SK1

Die PCR wurde mit der GoTaq Polymerase (#M3171) von Promega durchgeführt. 5x *Green Reaction Buffer* enthält bereits 1,5 mM MgCl₂, Puffer und zwei Farbstoffe, so dass der gesamte Ansatz direkt nach der PCR auf ein Agarosegel gegeben werden kann. Als Template diente pEGFP-C2-wt-hSK1 (20 ng/μl). Die Primer enthielten LIC *sites* für die ligationsunabhängige Klonierung (Stols et al. 2002). Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen, wobei die DNA zuerst für zwei Minuten bei 95 °C denaturiert wurde. Anschließend folgten pro Zyklus jeweils ein Denaturierungsschritt (60 Sekunden bei 95 °C), ein Annealingschritt (60 Sekunden bei 60 °C) und ein Elongationsschritt (90 Sekunden bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Elongationsschritt von fünf Minuten. Für einen Ansatz von 150 μl wurden 30 μl 5x *Green GoTaq Reaction Buffer*, 6 μl PCR-Nucleotide Mix 10 mM, jeweils 7,5 μl verdünnter (10 pmol/μl) *forward* und *reverse* Primer, 3 μl GoTaq Polymerase und 3 μl verdünntes Template (20 ng/μl) eingesetzt und mit Nuclease-freiem Wasser aufgefüllt.

2.2.5. Vektorverdau und PCR-Produktverdau

Der pMCSG9-Vektor wurde mit *SspI* (New England Biolabs) geschnitten (Donnelly et al. 2006). Für einen Ansatz von 100 μl wurden 8 μg Vektor, 10 μl 10x *SspI*-Puffer und 8 u *SspI* (5 u/μl) mit Nuclease-freiem Wasser aufgefüllt und sechs Stunden bei 37 °C inkubiert.

Das Produkt der hSK1-PCR wurde nach erfolgter Gelelektrophorese und Aufreinigung analog mit *BamHI* und *XbaI* (Fermentas) geschnitten.

2.2.6. Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer horizontalen Agarosegelelektrophorese in einem 1,5 %igen Gel in 1x TAE-Puffer bei 100 V getrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde O'Gene Ruler 1 kbp DNA-Leiter (*ready-to-use*, 250-10000 bp) von Fermentas verwendet.

2.2.7. Restriktionsverdau

Das passende DNA-Fragment aus dem PCR-Ansatz und der verdaute Vektor wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit aufgereinigt. Für einen Ansatz von 20 µl wurden 1 µg des PCR-Produkts mit 2 µl 10xLIC-Puffer, 1 µl LIC-qualified T4 DNA-Polymerase (2,5 u/µl), 2 µl 25 mM dCTP und Nuclease-freiem Wasser aufgefüllt und 30 Minuten bei 22 °C inkubiert. Beim Vektor wurde an Stelle von dCTP dGTP verwendet. Anschließend erfolgte jeweils ein Inaktivierungsschritt für 20 Minuten bei 75 °C.

2.2.8. Ligation und Hitzeschocktransformation

Für die Ligation wurde 1 µl verdauter Vektoransatz mit 2 µl verdaulichem PCR-Ansatz und 1 µl EDTA versetzt und 5 Minuten bei 22 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde in kompetente XL1blue-E.coli Bakterien transformiert und auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen.

2.2.9. Kompetente Bakterienstämme und Elektroporation

Für die Herstellung kompetenter XL1-Bakterien wurden 1,5 ml Übernachtskultur in 150 ml frisches LB-Medium überführt und die Kultur bis zu einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,6 ($\lambda=595$ nm) kultiviert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 2500 rpm und 4 °C wurde das Pellet in 50 ml TFB I Puffer aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 15 Minuten bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 4 ml TFB II Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 15 bis 30 Minuten wurde die Suspension zu 100 µl aliquotiert.

Für die Herstellung elektrokompetenter Rosetta-Bakterien wurde das Pellet nach dem ersten Zentrifugationsschritt zweimal mit jeweils 25-50 ml eiskaltem ddH₂O gewaschen, um alle Salze des LB-Mediums möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in 400 µl eiskaltem 20 %igen Glycerol resuspendiert und zu 50 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Elektroporation erfolgte in speziellen Küvetten mit einem Plattenabstand von zwei Millimetern. Zuerst wurden das LB-Medium auf 37 °C vorgewärmt und die Rosetta-Bakterien

auf Eis langsam aufgetaut. 1 μ l DNA (10 ng/ μ l) wurde in der Kuvette vorgelegt, die Bakterien vorsichtig dazupipettiert und die Kuvette in den Elektroporator gestellt. Dieser wurde auf 2,5 kV eingestellt. Beide Pulse-Knöpfe wurden gleichzeitig und solange gedrückt gehalten, bis ein Signalton das vollständige Entladen des Plattenkondensators anzeigte. Anschließend wurden 200 μ l warmes LB-Medium in die Kuvette gegeben, die gesamte Suspension in ein Eppi überführt und 45 Minuten bei 37 °C geschüttelt. 20 μ l der Suspension wurden auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.10. Proteinexpression und -aufreinigung

2.2.10.1. Bakterielle Expression von hSK1-pMCSG9

Für die Herstellung von humanem Sphingosinkinase-1-Protein wurden 100 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit dem Cryostock (Rosetta) von hSK1-pMCSG9 angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler kultiviert.

Die Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen in 1000 ml 2xYT-Medium überführt und bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler bis zu einer OD (600 nm) von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (f.c.) induziert. Nach weiteren drei Stunden Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Bakterienkultur in Greinerröhrchen überführt und bei 6000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml Equilibrierungspuffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.10.2. Aufreinigung der hSK1 über Amylose

Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis, indem die Bakteriensuspension achtmal 30 Sekunden mit dem Ultraschallstab mit 20 % der gerätespezifischen Maximalleistung beschallt wurde. Die Suspension wurde anschließend in Greinerröhrchen überführt und für 15 Minuten bei 4 °C und 6000 rpm zentrifugiert. Die Aufreinigung erfolgte in zwei Schritten; im ersten Schritt über eine Amylosesäule und im zweiten Schritt über Ni-NTA-Säule (Nallamsetty und Waugh 2007).

In einem Röhrchen wurden 6 ml Amylose zweimal mit jeweils 20 ml Equilibrierungspuffer (1) gewaschen. Dann wurden die Überstände der Bakteriensuspension zur trockenen Amylose gegeben. Die Röhrchen wurden anschließend auf Eis liegend über Nacht auf dem Western Blot-Schüttler bei 4 °C bewegt, um das Protein an die Amylose zu binden.

Eine Glassäule wurde bei 4 °C mit 5 ml Waschpuffer (2) gespült, die Amylosesuspension auf die Säule gegeben, der Durchfluss verworfen und die Säule viermal mit jeweils 10 ml Waschpuffer (2) gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit 2 ml Eluierungspuffer (3) eluiert.

2.2.10.3. Aufreinigung der hSK1 über Ni-NTA

Das Eluat der Amylosesäule wurde in einem Greinerröhrchen zu 2 ml dreimal mit 20 ml 4 °C kaltem Equilibrierungspuffer (A) gewaschener Ni-NTA-Agarose gegeben und über Nacht auf dem Western Blot-Schüttler bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Röhrchen bei 6000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und 5 ml Waschpuffer (B) zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation auf dem Western Blot-Schüttler wurde wiederum zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zehnminütiger Inkubation mit 1,5 ml Elutionspuffer (C) wurde das Röhrchen noch einmal zentrifugiert, der proteinhaltige Überstand in ein Eppi überführt und eine weitere Minute bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um restliche Ni-NTA-Agarose zu entfernen.

2.2.11. Proteinbestimmung nach Bradford

Zuerst wurde der Bradford-Premix durch Mischen von 2,0 ml Bradfordreagenz (Biorad) und 7,0 ml dH₂O hergestellt. Die Proteinproben wurden 1:100 in dH₂O verdünnt. Anschließend wurden jeweils 20 µl der BSA-Standards und 20 µl der verdünnten Proben in eine 96-well Platte gegeben und 180 µl Premix dazugeben. Die Proteinkonzentration wurde bei 595 nm bestimmt (Bradford 1976).

2.2.12. Sphingosinkinase-1-Assay

2x Assaypuffer, 10 µM NBD-SPH, 1 mM ATP und H₂O wurden in Röhrchen auf Eis vorgelegt und diese im Wasserbad bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert. Im Zeitverlauf wurde SK1-Protein dazugegeben und für weitere 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Der Assay wurde durch Zugabe von 2 ml eiskaltem Methanol gestoppt. Danach wurde 1 ml Chloroform zugegeben, gevortext und anschließend bei 1000 rpm zentrifugiert, um die Proteine abzutrennen. Die organisch-wässrige Phase wurde in ein frisches Röhrchen gegeben und dieses so weit wie möglich eingedampft. Jeweils 20 µl des Rückstands und 5 µl 100 µM

NBD-SPH als Standard wurden auf eine Dünnschichtchromatographie (DC)-Platte aufgetragen (Merck) und mit Butanol/Essigsäure/H₂O im Verhältnis 3:1:1 als Laufmittel getrennt.

Die DC-Platte wurde am Pharos FX eingelesen und mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ ausgewertet.

2.2.13. Messung der Microscale Thermophorese

hSK1-Protein wurde mit eiskaltem Puffer (50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und 6 mM β -Mercaptoethanol) in einer 10 ml Amicon-Ultrafiltrationseinheit mit Magnetrührer (Millipore, Bedford, USA) gewaschen, um Imidazol zu entfernen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und das Protein mit NT-647, einem rot fluoreszierenden Farbstoff, nach der Anleitung des Herstellers markiert (Monolith NT Protein Labeling Kit, NanoTemper Technologies, München). G α_q -Protein wurde auf die gleiche Art mit NT-647 markiert.

Die Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen wurde mittels Microscale Thermophoresis bestimmt. Um die Bindungsaffinität zwischen zwei Proteinen zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe des möglichen Bindungspartners hergestellt, während die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Proteins konstant blieb (Weinert et al. 2011). Jede Probe wurde in eine Nanotemper-Kapillare (*standard treated capillary*) aufgezogen und verschlossen.

Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Daten wurden nach GraphPad Prism exportiert und das Thermophoresesignal gegen die logarithmische Konzentration des möglichen Bindungspartners aufgetragen. Der k_D -Wert für jede Serie wurde anschließend durch das Anlegen einer nicht-linearen Regressionskurve bestimmt.

2.2.14. Transfektion mit Lipofectamin 2000 und TurboFect

Für die Transfektion der Plasmid-DNA in HEK3-G418 Zellen wurde Lipofectamin 2000 verwendet. Dafür wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion auf 6 cm-Schälchen ausgelegt und mit 1 bis 6 μ g DNA und 10 μ l Lipofectamin 2000 nach Vorgabe des Herstellers transfiziert. Nach einer Inkubationsdauer von 6 Stunden wurde das serumfreie Medium durch serumhaltiges ersetzt. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in 8-wells ausgelegt und abends serumfrei gesetzt, um sie am folgenden Tag zu mikroskopieren.

Zur Transfektion der Plasmid-DNA in MEFs wurde Turbofect verwendet. Dafür wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion auf 6cm-Schälchen ausgelegt und mit 1 bis 6 µg DNA und 10 µl Turbofect nach Vorgabe des Herstellers transfiziert. Nach einer Inkubationsdauer von 4 Stunden wurde das serumfreie Medium durch serumhaltiges ersetzt. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in 8-wells ausgelegt und abends serumfrei gesetzt, um sie am folgenden Tag zu mikroskopieren.

2.2.15. Messung der SK1-Translokation

Fluoreszenzbilder und Zeitserien wurden mit einem Zeiss LSM510 Meta Laserscanning-Mikroskop und einem Plan-Apochromat 63×/1.4 Ölimmersionsobjektiv aufgenommen. Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) behandelte 8-wells (Ibidi) ausgesät und während der Aufnahmen in HBSS aufbewahrt.

Die folgenden Exzitationslinien und Emissionsfilter wurden verwendet: für Cerulean 458/BP465 - 505 nm, für GFP 488/LP505 nm und für YFP 514/BP525 - 600 nm.

2.2.16. Immunfärbung und Fluoreszenzaufnahmen

Die MEFs wurden in eiskalter 4%iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für eine Stunde auf Eis fixiert, gewaschen und mit eiskaltem Methanol permeabilisiert. Anschließend wurde mit 5 %iger Milch für eine Stunde geblockt, die Zellen mit dem Erstantikörper für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und dann mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper für eine weitere Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die folgenden Exzitationslinien und Emissionsfilter wurden verwendet: für Cerulean 458/BP465 - 505 nm, für GFP 488/BP505 - 530 nm oder LP505 nm, für YFP 514/BP525 - 600 nm und für Alexa Fluor555 561/LP615 nm.

2.2.17. Phospholipase C-Assay

Auf einer 145 mm-Schale wurden HEK3-G418 Zellen mit Lipofectamin2000 mit jeweils 24 µg DNA (entweder GFP-SK1 oder GFP-Leervector bzw. entweder SK1-G82D Mutante oder pcDNA3.1) nach Herstellerangaben transfiziert und am nächsten Tag auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) behandelte 6 cm-Schälchen ausgelegt. Nach einem weiteren Tag wurden die Zellen serumfrei gesetzt mit Medium, das zusätzlich 1 µCi/ml ³H-Inositol enthielt. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit HBSS gewaschen, das zusätzlich 1 mM LiCl enthielt, und für 20

Minuten mit HBSS stimuliert, das zusätzlich 1 mM LiCl und entweder 100 μ M Carbachol oder H₂O enthielt. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Überstand abgesaugt und 2 ml Methanol zu den Zellen gegeben. Das Pellet wurde in Plastikröhrchen überführt und 1 ml H₂O und 2 ml Chloroform zu jedem Plastikröhrchen zugegeben. Nach dem Vortexen und dem Zentrifugieren bei 1000 rpm wurde die wässrige Phase, die die Inositolphosphate IP, IP₂, und IP₃ enthielt, auf Poly-Prep AG 1-X8 Formiat Säulchen (Bio-Rad) überführt. Die Säulchen wurden mit 6 ml H₂O und 5 ml 50 mM NH₄HCOO gespült. Die IPs wurden mit 5 ml 1 M NH₄HCOO und 0,1 M Ameisensäure eluiert. Die Menge an Radioaktivität wurde durch Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail zu 1 ml der eluierten Fraktion bestimmt.

2.2.18. Western Blotting

Die Gelapparatur (1,5 mm Plattenabstand) wurden mit EtOH gespült, trocken gelassen und zusammen gebaut. Das Trenngel wurde in die Gelform gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach dem Festwerden des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen und der 10er Kamm (1,5 mm) eingesetzt.

Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 Minuten auf 96 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert.

Die Gelkammer wurde mit 1-fach SDS-Puffer bis zur Markierung befüllt. Anschließend wurden Marker (10 μ l) und Proben (20 μ l) in die Taschen pipettiert. Das SDS-Gel wurde bei 100 V für ca. 90 Minuten laufen gelassen.

Die PVDF-Membran wurde mit Isopropanol befeuchtet und anschließend in Blotting Buffer (Transferpuffer nach Towbin) 5 Minuten gewaschen. Ein Stapel aus drei in Transferpuffer getauchten Whatman-Papieren, der Membran, dem Gel und drei weiteren Whatman-Papieren wurde bei 200 mA 55 Minuten geblottet (Semi-dry Methode).

Anschließend wurden die Membranen markiert und ca. 10 Minuten mit PBST gewaschen. Danach wurden sie mit 5 %iger Milch eine Stunde geblockt. Die Membranen wurden mit dem ersten Antikörper in 0,5% Milch über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran viermal 15 Minuten mit PBST gewaschen und mit dem Zweitantikörper in 0,5 % Milch für 1½ Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde zweimal 15 Minuten mit PBST gewaschen und 2 ml ECL-Reagenz für 60 bis 90 Sekunden auf die Membran gegeben und der Film entwickelt.

2.2.19. Statistische Auswertung

Die gezeigten Fluoreszenzbilder sind repräsentative Bilder aus jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchsreihen. Die Bilder wurden mit der Zeiss-Software ZEN2007 oder mit ImageJ weiterbearbeitet und ausgewertet. Die Translokationshalbwertszeit der YFP-mSK1 wurde bestimmt, indem die Intensität des Fluoreszenzsignals innerhalb eines definierten cytosolischen Bereichs in Abhängigkeit von der Zeit gemessen wurde und anschließend eine exponentielle Funktion über die translokationsbedingte Abnahme der cytosolischen Fluoreszenzwerte gelegt wurde. Unter den gewählten Bedingungen war das Ausbleichen des Präparates vernachlässigbar.

Alle statistischen Auswertungen sowie die Berechnung der Translokationshalbwertszeit, der AUC (*area under the curve*; Fläche unterhalb der Kurve) und des k_D -Wertes wurden mit GraphPad Prism durchgeführt.

Alle Mittelwerte werden als Mittel \pm SEM aus der angegebenen Anzahl an Experimenten (n) oder als Mittel \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit der angegebenen Anzahl an Einzelwerten (n) angegeben.

Individuell gezeigte $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen sind repräsentativ ausgewählt und innerhalb einer Versuchsreihe ($n \geq 3$ unabhängige Experimente) vergleichbar. Die AUC wurde durch Integration der Fläche zwischen basaler $[Ca^{2+}]_i$ und der $[Ca^{2+}]_i$ zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Stimulation mit dem jeweiligen Agonisten entweder bis zum Erreichen der Basislinie oder bis zu einem definierten Endpunkt bestimmt. Die Geschwindigkeit der Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ in MEFs, die mit Cameleon Ca^{2+} -Sensor transduziert worden waren, wurde durch Anlegen einer Tangente bestimmt. Die Geschwindigkeit der Abnahme der $[Ca^{2+}]_i$ in MEFs wurde als die Differenz zwischen maximaler $[Ca^{2+}]_i$ und der $[Ca^{2+}]_i$ 2 Minuten nach der Stimulation definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von S1P-Lyase-defizienten MEFs

3.1.1. Konzentrationen von S1P und Sphingosin in S1P-Lyase-defizienten MEFs

Eine genetische Ausschaltung der S1P-Lyase in der Maus führt zur Akkumulation von S1P und Sphingosin in verschiedenen Organen (Bektas et al. 2010; Vogel et al. 2009; Weber et al. 2009). In Lymphozyten, die aus S1P-Lyase-defizienten Mäusen isoliert worden waren, ließen sich jedoch nach mehreren Tagen in Kultur keine erhöhten S1P-Konzentrationen mehr feststellen (Weber et al. 2009). Deshalb sollten in den *Sgpl1*^{-/-}-MEFs zuerst die Konzentrationen von S1P und Sphingosin mittels LC-MS/MS (Schmidt et al. 2006) ermittelt werden. In unbehandelten *Sgpl1*^{+/+}-MEFs ergab sich für S1P ein Wert von $0,062 \pm 0,030$ ng/mg Protein (Mittelwert \pm SEM, n=4). In *Sgpl1*^{-/-}-MEFs ergab sich ein um den Faktor 6 erhöhter S1P-Wert von $0,304 \pm 0,071$ ng/mg Protein (Abb. 1). Die Konzentration an Sphingosin in S1P Lyase-defizienten MEFs war um den Faktor zwei erhöht ($2,36 \pm 0,77$ ng/mg Protein in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs und $4,469 \pm 1,733$ ng/mg Protein in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs) (Abb. 1).

Zusätzlich wurde der Effekt des Sphingosinkinaseinhibitors SKI-II (4-[[4-(4-Chlorophenyl)-2-thiazolyl]amino]phenol) auf den Lipidgehalt der MEFs untersucht. SKI-II inhibiert die SK1 mit einer IC₅₀ von etwa 0,5 μ M (French et al. 2003). Die Behandlung mit 10 μ M SKI-II über 16 Stunden reduzierte die erhöhten S1P-Spiegel in den *Sgpl1*^{-/-}-MEFs um mehr als zwei Drittel auf $0,064 \pm 0,016$ ng/mg Protein (Abb. 1). Auch in den *Sgpl1*^{+/+}-MEFs wurde durch Behandlung mit SKI-II der S1P-Spiegel auf $0,022 \pm 0,004$ ng/mg Protein reduziert. Diese Änderung war allerdings nicht signifikant. Durch die Behandlung mit SKI-II wurde auch der Sphingosingehalt jeweils reduziert ($1,26 \pm 0,39$ ng/mg Protein in *Sgpl1*^{+/+}- und $3,608 \pm 0,901$ ng/mg Protein in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs) (Abb. 1). Die Änderung des Sphingosingehalts durch SKI-II war in den *Sgpl1*^{-/-}-MEFs signifikant, nicht jedoch in den *Sgpl1*^{+/+}-MEFs.

Folglich kann die Inhibierung der Sphingosinkinase zumindest teilweise der S1P-Lyase-Defizienz entgegenwirken.

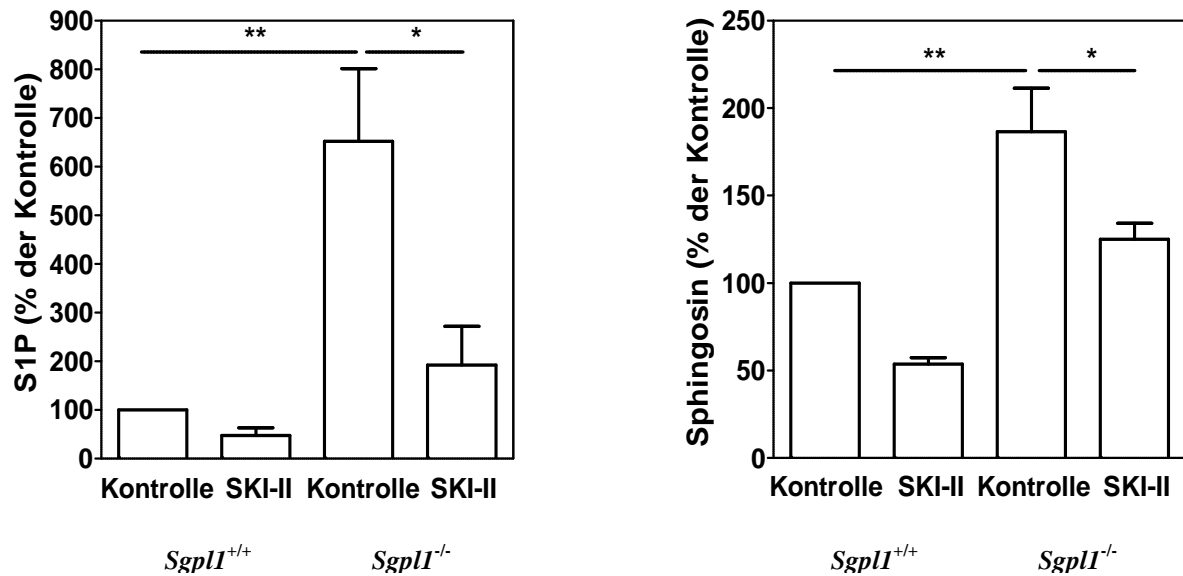


Abb. 1. Konzentration von S1P und Sphingosin in *Sgpl1*^{+/+}- und *Sgpl1*^{-/-}-MEFs. Die Zellen wurden für 16 Stunden entweder mit Lösungsmittel (0,1 % DMSO; Kontrolle) oder mit 10 μ M SKI-II behandelt. Anschließend wurde der Lipidgehalt mittels Flüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie bestimmt. Der Gehalt an Sphingosin und S1P wurde auf DMSO-behandelte Wildtyp-Zellen normiert, in denen die absolute Konzentration von S1P $0,062 \pm 0,030$ ng/mg Protein und von Sphingosin $2,36 \pm 0,77$ ng/mg Protein betrug. (Mittelwerte \pm SEM, n=4). *: p<0.05; **: p<0.01 (one-way ANOVA).

3.1.2. Ca^{2+} -Homöostase in S1P-Lyase-defizienten MEFs auf Einzelzellebene

In Vorarbeiten (ter Braak 2008) waren Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an mit Fura-2 beladenen MEFs in Suspension durchgeführt worden, die eine erhöhte basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und verstärkte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten sowie Thapsigargin in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs gezeigt hatten (Claas et al. 2010). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen an Zellen in Suspension können jedoch leicht durch Artefakte beeinflusst werden. So können einige wenige Zellen mit extrem hoher basaler $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine allgemein mäßig erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vortäuschen. Deshalb war es wichtig, Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an den MEFs auf Einzelzellebene durchzuführen. Hierfür wurde der Cameleon Ca^{2+} -Sensor verwendet, der ähnlich wie das bei $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen in Zellsuspension häufig verwendete Fura-2 die Berechnung eines Fluoreszenzverhältnisses und damit eine quantitative Auswertung ermöglicht (Evanko und Haydon 2005). Darüber hinaus hat Cameleon den Vorteil, aufgrund seiner Proteinstruktur praktisch nicht kompartmentalisiert zu werden. Die Ca^{2+} -komplexierenden, chemischen Farbstoffe Rhod3 und Fluo4 akkumulierten hingegen in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs stark in intrazellulären Kompartimenten und konnten deswegen nicht für $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen verwendet werden (Ihlefeld; persönliche Kommunikation). Fura-2 schied für die Verwendung am Laserscanningmikroskop (LSM) ebenfalls aus, da es Anregungswellenlängen von 340 nm und 380 nm aufweist und die kürzeste Laserlinie des LSM 405 nm beträgt.

Der Cameleon Ca^{2+} -Sensor ist ein proteinbasierter Farbstoff, der die Ca^{2+} -abhängige Bindung von Calmodulin an das M13-Protein zur Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nutzt. Durch Fusionierung von ECFP an Calmodulin und Fusionierung von Venus, einer leuchtstärkeren EYFP Variante, an das M13-Protein, kommt es bei geringer räumlicher Nähe zur Übertragung von Energie von ECFP auf Venus. Diesen Effekt nennt man Förster-Resonanzenergietransfer oder auch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) (Chudakov et al. 2010). Das FRET-Signal wird dabei durch Annäherung der fluoreszierenden Proteine aufgrund des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs verstärkt, d.h. die Fluoreszenz von ECFP bei 485 nm nimmt ab, während gleichzeitig die Fluoreszenz von Venus bei 535 nm zunimmt. Zur Auswertung wird das Emissionsverhältnis von Venus zu ECFP bei gleich bleibender Exzitationsstärke von ECFP gebildet. Die Dissoziationskonstante von Cameleon liegt bei 250 nM (Nagai et al. 2004) und ist daher mit der von Fura-2 (224 nM) vergleichbar (Grynkiewicz et al. 1985).

Die Lokalisation von Cameleon in einzelnen *Sgpl1*^{+/+}- und *Sgpl1*^{-/-}- MEFs ist in Abb. 2 dargestellt. Cameleon zeigt eine annähernd homogene Verteilung ohne innerhalb intrazellulärer Kompartimente zu akkumulieren. Der Zeitverlauf der Änderung der

Fluoreszenzintensität nach Zugabe des SERCA-Inhibitors Thapsigargin (1 μM) ist in Abb. 3 dargestellt. Wie erwartet führt Thapsigargin zu einem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, d. h. zu einem Anstieg der Venus-Fluoreszenz und zu einer Abnahme der ECFP-Fluoreszenz.

Durch Messungen mit Thapsigargin konnten in *Sgpl1*^{+/+}- und *Sgpl1*^{-/-}-MEFs je zwei verschiedene Subtypen von Zellen unterschieden werden, jeweils einer mit einem schnellen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg und einer mit einem langsamen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Zellen mit einem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg größer als 0,2 Einheiten/s bezogen auf das Fluoreszenzverhältnis wurden als schnell, diejenigen mit einem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg kleiner als 0,2 Einheiten/s bezogen auf das Fluoreszenzverhältnis wurden als langsam eingestuft. Die gemittelten Zeitverläufe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind in Abb. 4 dargestellt. Zellen mit einem langsamen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg zeigten eine langsame Normalisierung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, während Zellen mit einem schnellen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg eine rasche Normalisierung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigten. Ein schneller $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg korrelierte dabei in beiden Zellsubtypen signifikant mit einer schnellen Abnahme des Ca^{2+} -Signals ($p < 0,001$). Das Verhältnis der Zellen mit schnellem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in Bezug auf die Gesamtmenge der Zellen war mit 37 % in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs und 39 % in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs in beiden Zellsubtypen vergleichbar.

Wie in Abb. 5 dargestellt, war die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in beiden Zellsubtypen der *Sgpl1*^{-/-}-MEFs höher als in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs, der Unterschied war aber nur in den Zellen mit schnellem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg signifikant ($p < 0,05$). Der Unterschied im maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nach der Stimulation mit Thapsigargin war dagegen nur in Zellen mit langsamen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg signifikant ($p < 0,05$). Die Fläche unterhalb der Kurve (AUC) des Zeitverlaufs nach der Stimulation mit Thapsigargin, die am besten die Ca^{2+} -Speicherung in den Thapsigargin-sensitiven Speichern widerspiegelt, war sowohl in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs mit langsamem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg (157 % der Kontrolle) als auch in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs mit schnellem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg (135 % der Kontrolle) im Vergleich zu *Sgpl1*^{+/+}-MEFs signifikant höher (jeweils $p < 0,01$).

Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Daten Gemeinsamkeiten und grundlegende Unterschiede zwischen *Sgpl1*^{+/+}- und *Sgpl1*^{-/-}-MEFs. So gibt es in beiden MEF-Linien Subpopulationen von Zellen mit einem schnellen und kurzen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg oder einem langsamen und langanhaltenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Die in Zellsuspension gemessene erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowie die vermehrte Ca^{2+} -Speicherung in Thapsigargin-sensitiven Speichern konnten durch die Einzelzellmessungen bestätigt werden. Die unterschiedlichen Zeitverläufe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale in den Subpopulationen sind bei Messungen in Zellsuspension nicht unterscheidbar. Die Einzelzellmessungen mit Cameleon ergänzen daher die mit Fura-2 in Zellsuspension erhaltenen Messungen.

Verglichen mit Messungen mit Fura-2 ist der Unterschied in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ zwischen *Sgpl1*^{+/+}- und *Sgpl1*^{-/-}-MEFs in den Messungen mit Cameleon allerdings deutlich kleiner, vermutlich weil Cameleon einen kleineren dynamischen Messbereich aufweist.

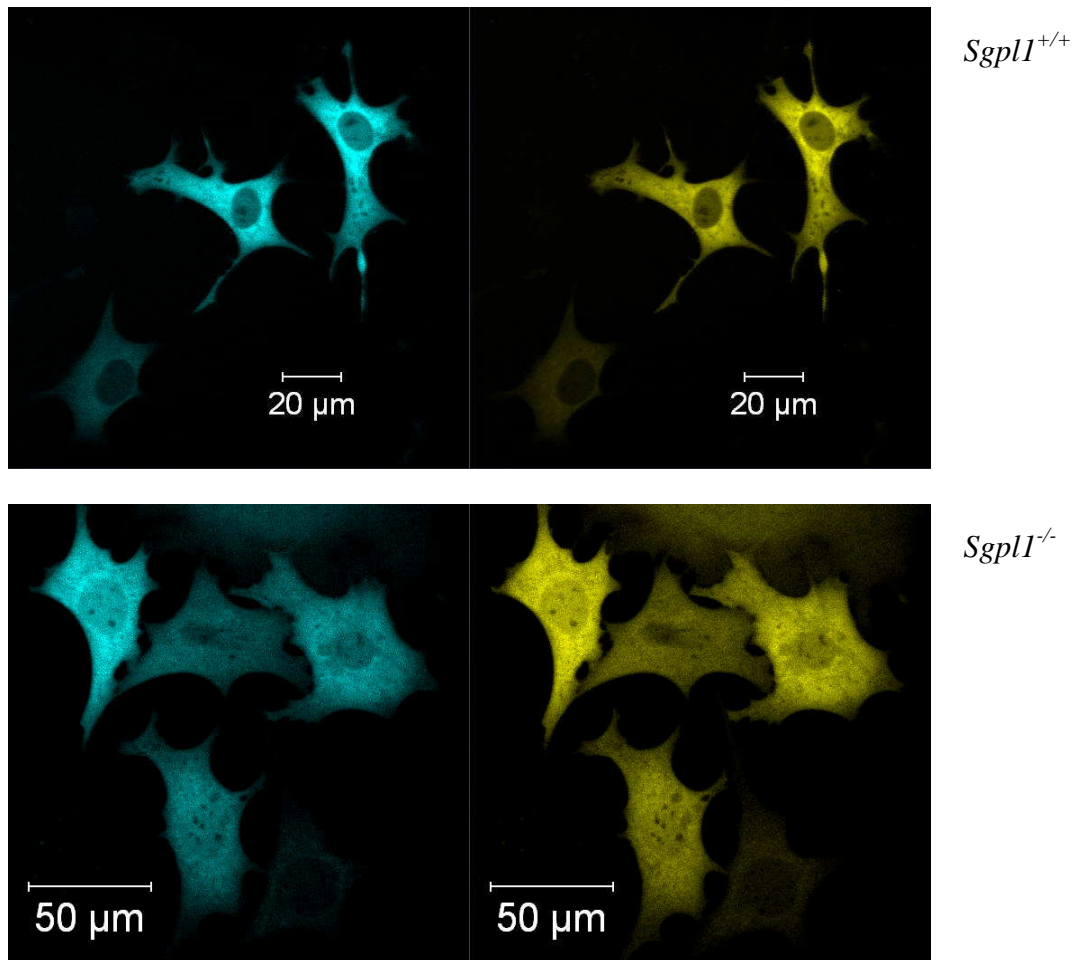


Abb. 2. Bilder von *Sgpl1*^{+/+}- und *Sgpl1*^{-/-}-MEFs, die mit dem Cameleon Ca^{2+} Sensor transduziert worden waren. Das linke Bild zeigt jeweils ECFP-Fluoreszenz, das rechte jeweils Venus (EYFP)-Fluoreszenz. Beide Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop aufgenommen (ECFP-Exzitation bei 405 nm, ECFP-Emission bei 465 - 510 nm und Venus-Emission bei 530 - 600 nm).

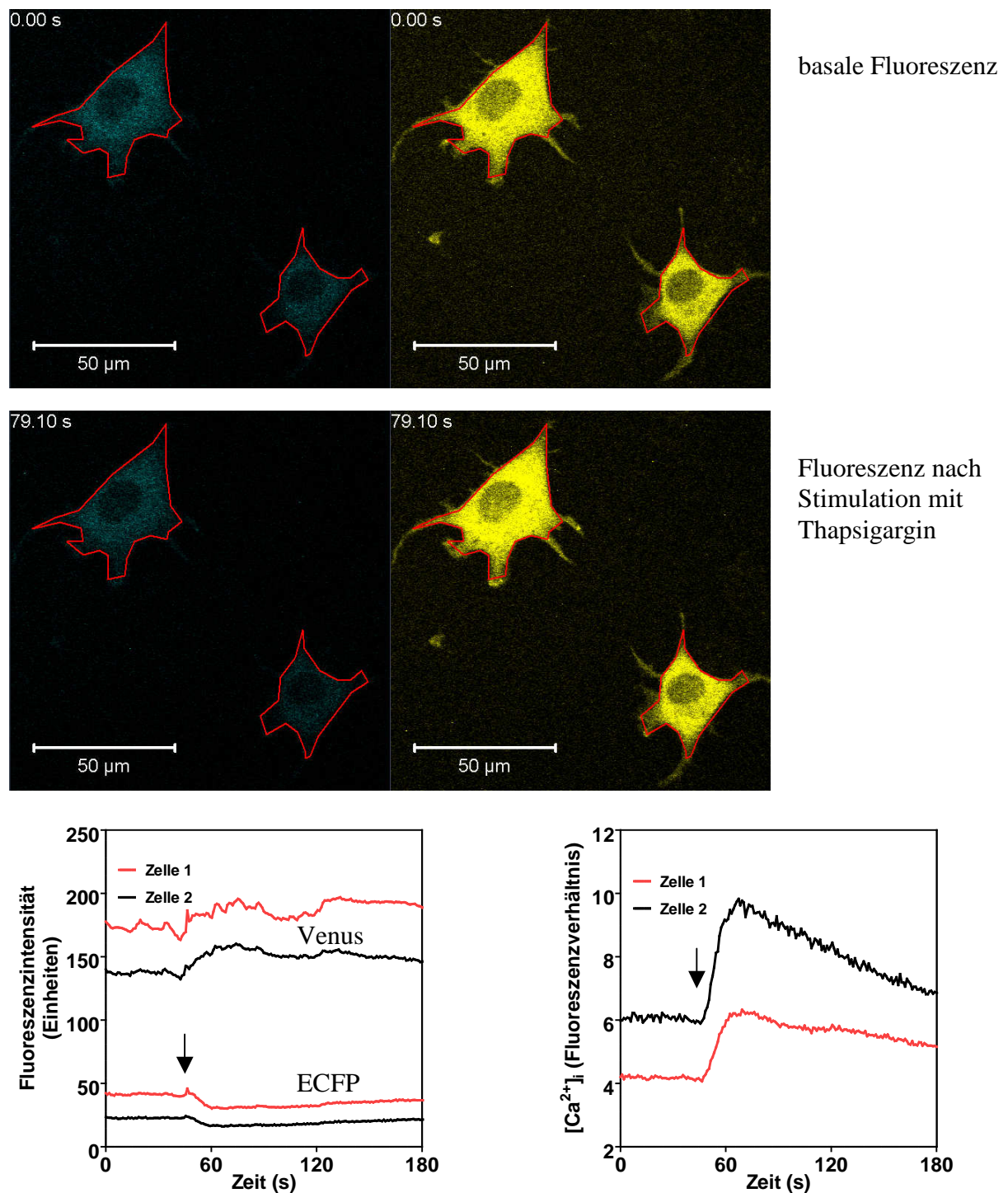


Abb. 3. Beispiel einer $[Ca^{2+}]_i$ -Messung mit dem Cameleon Ca^{2+} -Sensor. Die mikroskopischen Bilder zeigen zwei *Sgpl1*^{+/+}-MEFs vor und nach Stimulation mit Thapsigargin. Die Fluoreszenzintensität von ECFP und Venus wurde in den rot umrandeten Feldern mit den in Abb. 2 beschriebenen Exzitations- und Emissionswellenlängen gemessen, wobei im Zeitverlauf 1 Bild/s aufgenommen wurde. Die linke Grafik zeigt separat die ECFP- und Venus-Fluoreszenz, während in der rechten Grafik das Fluoreszenzverhältnis von Venus zu ECFP dargestellt ist. Nach 45 Sekunden (Pfeil) erfolgte die Zugabe von Thapsigargin (1 μ M).

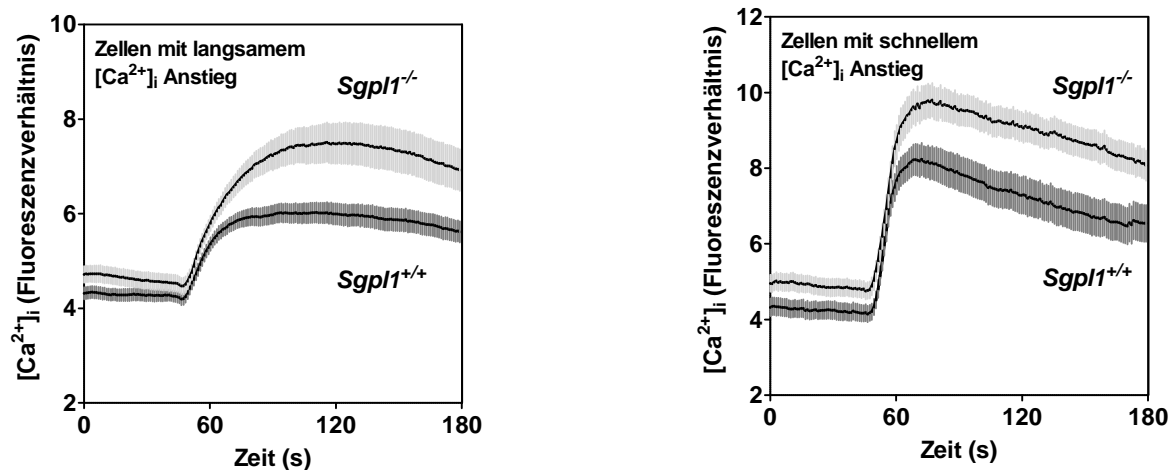


Abb. 4. $[Ca^{2+}]_i$ -Zeitverläufe, die durch Zugabe des SERCA-Inhibitors Thapsigargin in $Sgpl1^{+/+}$ - und $Sgpl1^{-/-}$ -MEFs induziert wurden. Die Messungen wurden mittels Laserscanningmikroskopie an einzelnen MEFs, die vorher mit dem Cameleon Ca^{2+} -Sensor transduziert worden waren, durchgeführt.

Gezeigt sind die $[Ca^{2+}]_i$ -Zeitverläufe von langsam reagierenden MEFs (Geschwindigkeit der Zunahme des $[Ca^{2+}]_i \leq 0,2$ Fluoreszenzverhältnis-Einheiten/s) und schnell reagierenden MEFs (Geschwindigkeit der Zunahme des $[Ca^{2+}]_i > 0,2$ Fluoreszenzverhältnis-Einheiten/s). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=39$ langsam reagierenden und 23 schnell reagierenden $Sgpl1^{+/+}$ -Zellen und $n=35$ langsam reagierenden und 22 schnell reagierenden $Sgpl1^{-/-}$ -Zellen.

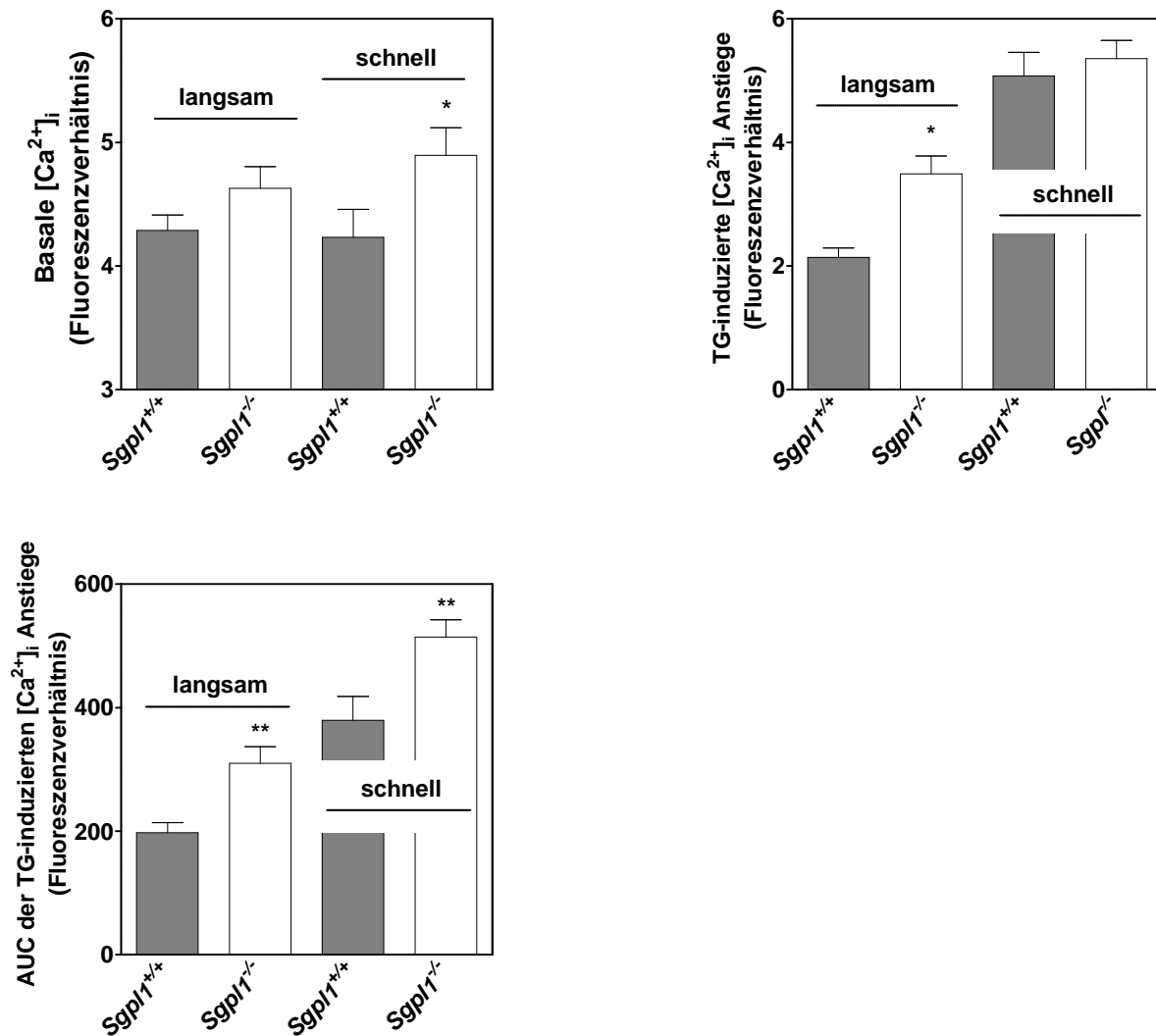


Abb. 5. Auswertung der in Abb. 4 gezeigten Thapsigargin-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege in *Sgpl1*^{+/+}-und *Sgpl1*^{-/-}-MEFs. Ausgewertet wurden die basalen [Ca²⁺]_i, die maximalen Thapsigargin (TG)-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege und die Fläche unterhalb der Kurve (AUC, *area under the curve*, gemessen bis 180 s). Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM von n=39 langsam reagierenden und 23 schnell reagierenden *Sgpl1*^{+/+}-Zellen und n=35 langsam reagierenden und 22 schnell reagierenden *Sgpl1*^{-/-}-Zellen. *: p<0.05; **: p<0.01 im t-Test.

3.2. Nachweis der autokrinen Sekretion von cis-4-Methylsphingosin-1-Phosphat

Cis-4-Methylsphingosin ist ein neuartiges Sphingosinanalogon, das sich von natürlichem D-erythro-Sphingosin durch eine zusätzliche Methylgruppe unterscheidet (van Echten-Deckert et al. 1997). Es wird von Zellen aufgenommen und phosphoryliert. In der Folge akkumuliert intrazellulär cis-4-Methylsphingosin-1-Phosphat (cis-4-Methyl-S1P) (van Echten-Deckert et al. 1997; van Echten-Deckert et al. 1998). Vorarbeiten hatten jedoch gezeigt, dass eine Inkubation von HEK-293-Zellen mit cis-4-Methylsphingosin zur Internalisierung von S1P-Rezeptoren führte (ter Braak et al. 2011). Diese Beobachtung legte nahe, dass cis-4-Methylsphingosin nach intrazellulärer Phosphorylierung als cis-4-Methyl-S1P sezerniert werden könnte und ähnlich wie FTY720-Phosphat als Agonist an S1P-Rezeptoren wirken könnte. Um diese Hypothese zu verifizieren, war es nötig, cis-4-Methyl-S1P im Überstand der Zellen nachzuweisen. Daher sollten die Konzentrationen von cis-4-Methylsphingosin und cis-4-Methyl-S1P mittels LC-MS/MS in Zellen und Überständen von HEK-293-Zellen bestimmt werden, die über Nacht mit 1 μ M oder 10 μ M cis-4-Methylsphingosin oder Lösungsmittel als Kontrolle behandelt worden waren (Schmidt et al. 2006). Um die unspezifische Dephosphorylierung von cis-4-Methyl-S1P durch Ektophosphatasen zu inhibieren, wurden die Zellen zusätzlich mit 1 mM Orthovanadat inkubiert (Gordon 1991).

Die Retentionszeiten betragen für Sphingosin, S1P, cis-4-Methylsphingosin und cis-4-Methyl-S1P $6,33 \pm 0,03$ min (n = 29), $6,91 \pm 0,02$ min (n = 29), $6,38 \pm 0,05$ min (n = 12) bzw. $6,92 \pm 0,02$ min (n = 9) (Mittelwerte \pm SD) (Abb. 6). In den Kontrollzellen wurden im Pellet $9,6 \pm 1,9$ ng Sphingosin / mg Protein und $0,50 \pm 0,05$ ng S1P / mg Protein nachgewiesen (Mittelwerte \pm SEM; n=3). In Gegenwart von Orthovanadat wurden im Pellet $7,3 \pm 0,5$ ng Sphingosin / mg Protein und $3,5 \pm 0,6$ ng S1P / mg Protein nachgewiesen (Mittelwerte \pm SD; n=3).

Da cis-4-Methyl-S1P nicht als Reinsubstanz zur Verfügung stand, weshalb keine Eichkurve mit diesem Lipid erstellt werden konnte, wurden die Konzentrationen von cis-4-Methylsphingosin durch Vergleich mit Sphingosin und diejenige von cis-4-Methyl-S1P durch Vergleich mit S1P ermittelt. Nach Inkubation für 16 Stunden mit 1 μ M cis-4-Methylsphingosin wurde im Vergleich zu Sphingosin intrazellulär etwa 50-mal mehr cis-4-Methylsphingosin detektiert. Daneben ließ sich auch cis-4-Methyl-S1P intrazellulär nachweisen (60 % der Konzentration von Sphingosin) (Abb. 6). Nach Inkubation für 16 Stunden mit 10 μ M cis-4-Methylsphingosin wurde im Vergleich zu Sphingosin intrazellulär sogar 270-mal mehr cis-4-Methylsphingosin detektiert. Die Konzentration von cis-4-Methyl-

S1P war intrazellulär 15-mal höher als die Konzentration von Sphingosin. Intrazellulär akkumulierten folglich beide Lipide, cis-4-Methylsphingosin und cis-4-Methyl-S1P.

In den Überständen waren Sphingosin und S1P nicht nachweisbar, cis-4-Methylsphingosin und cis-4-Methyl-S1P hingegen schon (Abb. 6). Im Überstand von Zellen, die mit 1 μ M cis-4-Methylsphingosin behandelt worden waren, wurden 2,4 % der zellulären cis-4-Methylsphingosin-Konzentration und 7,1 % der zellulären cis-4-Methyl-S1P-Konzentration nachgewiesen. Die Behandlung mit 10 μ M cis-4-Methylsphingosin führte zur Akkumulation von 8,4 % der Konzentration von zellulärem cis-4-Methylsphingosin und 31,0 % der Konzentration von zellulärem cis-4-Methyl-S1P im Überstand.

Vergleichbare Experimente wurden mit 1 μ M FTY720 durchgeführt, allerdings in Abwesenheit von Orthovanadat, da FTY720-Phosphat relativ phosphatasestabil ist und nur durch die Lipidphosphatase LPP3 dephosphoryliert wird (Mechtcheriakova et al. 2007). In Zellpellets wurden $27,0 \pm 5,4$ ng FTY720/mg und $2,18 \pm 0,39$ ng FTY720-Phosphat/mg Protein nachgewiesen. Dies entspricht 280 % bzw. 23 % der Konzentration von zellulärem Sphingosin. Nach der Inkubation mit FTY720 tauchten $5,7 \pm 0,2$ % der Gesamtkonzentration von FTY720 und $4,5 \pm 2,5$ % der Gesamtkonzentration von FTY720-Phosphat im Überstand auf (Mittelwerte \pm SEM, n = 3). Dies bedeutet, dass die Konzentration von cis-4-Methyl-S1P im Überstand mindestens in der gleichen Größenordnung wie die Konzentration von FTY720-Phosphat liegt.

Cis-4-Methylsphingosin wird folglich intrazellulär phosphoryliert und anschließend exportiert. Der Nachweis von cis-4-Methyl-S1P im Überstand von HEK-293-Zellen war die Voraussetzung für die Annahme, dass cis-4-Methylsphingosin ähnlich wie FTY720 als Prodrug eines S1P-Rezeptor-Agonisten fungieren könnte. Weitergehende Versuche zeigten tatsächlich, dass cis-4-Methylsphingosin zur Internalisierung insbesondere der S1P-Rezeptoren S1P₂ und S1P₃ führt, weniger stark jedoch von S1P₁, der die immunsupprimierende Wirkung von FTY720 vermittelt (ter Braak et al. 2011). Im Gegensatz zu FTY720 verursachte cis-4-Methylsphingosin eine Desensibilisierung der durch S1P induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiege, die durch die S1P-Rezeptoren S1P₂ und S1P₃ vermittelt werden. Cis-4-Methyl-S1P könnte somit als Leitstruktur für die Entwicklung neuer S1P_{2/3}-Rezeptor-Agonisten dienen.

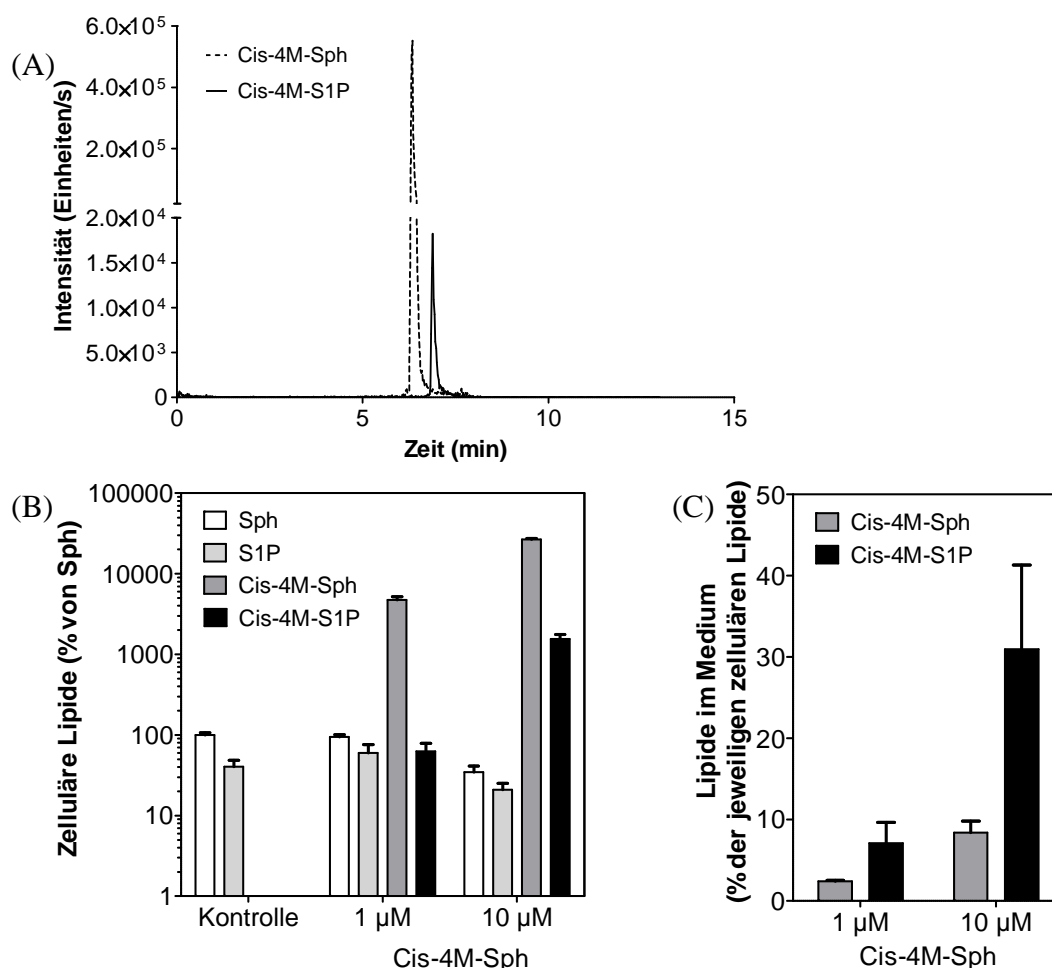


Abb. 6. Nachweis von cis-4-Methylsphingosin-1-Phosphat im Überstand von HEK-293-Zellen und im Zellpellet mittels LC-MS/MS.

(A) Repräsentatives Chromatogramm des Überstandes von HEK-293-Zellen, die für 16 Stunden in Gegenwart von 1 mM Orthovanadat mit 10 µM cis-4-Methylsphingosin behandelt worden waren.

(B) Zelluläre Konzentrationen von Sphingosin, S1P, cis-4-Methylsphingosin und cis-4-Methyl-S1P in HEK-293-Zellen, die für 16 Stunden in Gegenwart von 1 mM Orthovanadat mit Lösungsmittel, 1 µM oder 10 µM cis-4-Methylsphingosin behandelt worden waren.

Die Peakflächen der verschiedenen Lipide wurden auf den jeweiligen internen Standard normalisiert und die Konzentration der Lipide in % von Sphingosin angegeben (Mittelwerte ± SD, n = 3).

(C) Lipidkonzentration im Überstand von HEK-293-Zellen, die für 16 Stunden in Gegenwart von 1 mM Orthovanadat mit 1 µM oder 10 µM cis-4-Methylsphingosin behandelt worden waren.

Die Peakflächen von cis-4-Methylsphingosin und cis-4-Methyl-S1P wurden auf den jeweiligen internen Standard normalisiert und die Konzentration der beiden Lipide in % der intrazellulären Konzentration angegeben (Mittelwerte ± SD, n = 3).

3.3. Regulation der SK1 durch $G\alpha_q$

3.3.1. Hemmung der SK1-Translokation durch katalytisch inaktive GRK2

Die SK1 wird durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli akut aktiviert, bspw. durch Agonisten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptortyrosinkinasen, aber auch durch Zytokine wie TNF- α , TGF- β oder Interferon- γ (Alemany et al. 2007). In vielen Fällen geht die akute Aktivierung der SK1 mit einer Translokation vom Cytosol an die Plasmamembran einher (Lidington et al. 2009). Insbesondere nach Aktivierung G_q -gekoppelter Rezeptoren ist die Translokation stark ausgeprägt (ter Braak et al. 2009).

Die SK1-Translokation wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie in HEK-293-Zellen, die stabil den muskarinischen Acetylcholinrezeptor vom Subtyp M_3 exprimierten, untersucht. Der M_3 -Rezeptor koppelt effektiv an $G_{q/11}$ -Signalwege (Caulfield und Birdsall 1998; Offermanns et al. 1994). Alle verwendeten Konstrukte der SK1 (hSK1-Cerulean, YFP-mSK1 und GFP-hSK1) waren unter basalen Bedingungen im Cytosol lokalisiert und translozierten nach Stimulation des M_3 -Rezeptors mit vergleichbaren Halbwertszeiten an die Plasmamembran.

Die Serin/Threoninkinase G-Protein-gekoppelte-Rezeptorkinase-2 (GRK2) spielt eine wichtige Rolle bei der Desensibilisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, indem sie die Rezeptoren phosphoryliert und die aktivierten G-Proteine sequestriert. Mit ihrer *regulator of G protein signalling homology domain* (RH-Domäne) bindet die GRK2 an spezifische Aminosäurereste des aktivierten $G\alpha_q$, die für die Aktivierung des klassischen $G\alpha_q$ -Effektors PLC β benötigt werden. Auf diese Weise sequestriert die GRK2 aktiviertes $G\alpha_q$ und inhibiert die $G\alpha_q$ -PLC β -Interaktion (Tesmer et al. 2005). Folglich ist die GRK2 selbst ein $G\alpha_q$ -Effektor.

Um zu untersuchen, ob die Bindung der GRK2 an $G\alpha_q$ einen Einfluss auf die G_q -vermittelte SK1-Aktivierung haben könnte, wurde eine katalytisch inaktive Mutante der GRK2 (GRK2-kd) verwendet, denn für die Interaktion mit $G\alpha_q$ wird die katalytische Aktivität der GRK2 nicht benötigt. Außerdem bewirkt die GRK2-kd keine Phosphorylierung und folglich keine Inaktivierung des M_3 -Rezeptors, so dass dies bei der Interpretation der Effekte nicht bedacht werden muss. Die Translokationshalbwertszeit der YFP-mSK1 wurde in HEK-293-Zellen bestimmt, welche mit GRK2-kd oder Leervektor cotransfiziert worden waren. In den Kontrollzellen führte die Stimulation des M_3 -Rezeptors mit 100 μ M Carbachol zu einer schnellen und lang andauernden Translokation der YFP-mSK1 an die Plasmamembran. Die Cotransfektion mit GRK2-kd bewirkte hingegen eine vollständige Hemmung der Carbachol-

induzierten Translokation der YFP-mSK1 (Abb. 7). Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Unterdrückung der SK1-Translokation durch die Überexpression von GRK2-kd ist die Abhängigkeit der SK1-Translokation von $G\alpha_q$ oder sogar eine Konkurrenz zwischen der SK1 und GRK2-kd um gleiche Bindungsstellen an $G\alpha_q$.

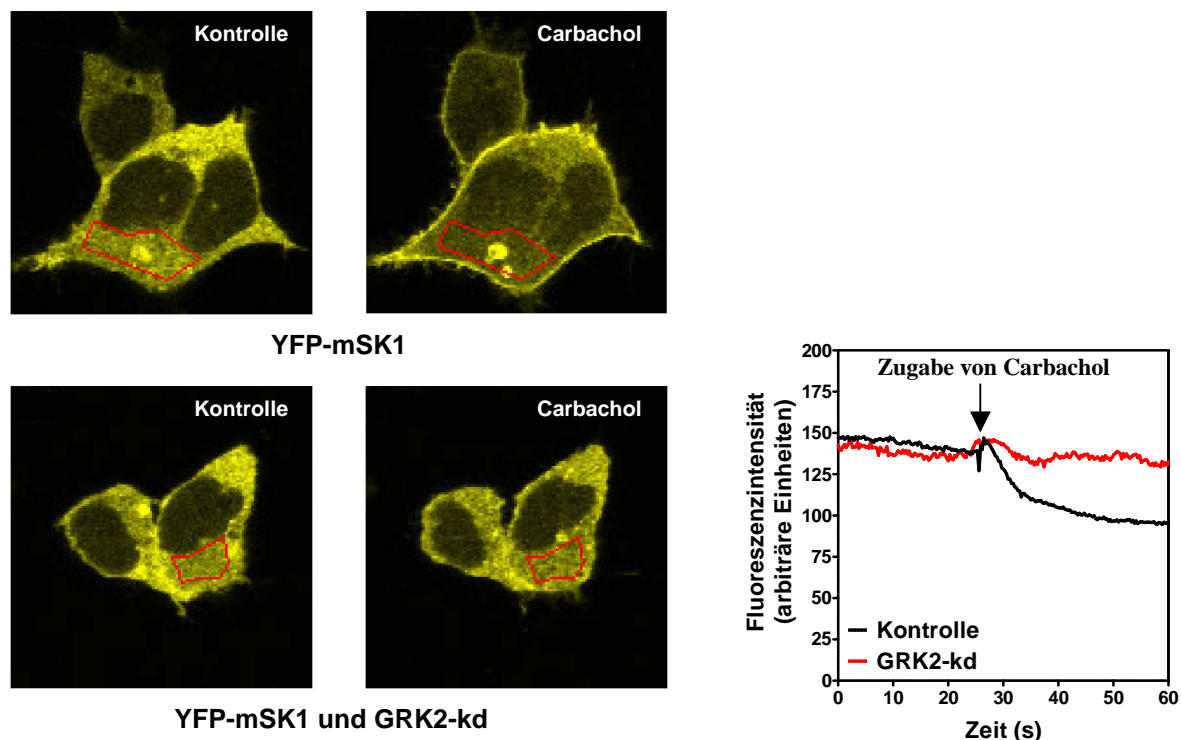


Abb. 7. Hemmung der SK1-Translokation durch katalytisch inaktive GRK2. HEK-293-Zellen, die den M_3 -Rezeptor stabil exprimieren, wurden mit YFP-mSK1 und entweder Leervektor oder einer katalytisch inaktiven Form der GRK2 (GRK2-kd) cotransfiziert. Mittels konfokaler Mikroskopie wurde eine Zeitserie von Bildern erstellt. Während der Zeitserie wurden die Zellen mit Carbachol stimuliert. Die Bilder zeigen die Lokalisation der YFP-mSK1 vor und 1 Minute nach Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ Carbachol. In den rot umrandeten zytosolischen Regionen wurde jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität in diesen Regionen ist rechts dargestellt. Die Abbildung zeigt ein typisches Experiment, das mehrmal mit gleichem Ergebnis wiederholt wurde.

3.3.2. Einfluss des PIP₂-Gehaltes der Plasmamembran auf die Translokationsgeschwindigkeit der SK1

Es ist bekannt, dass die SK1 an die Membranlipide Phosphatidylserin (Stahelin et al. 2005) und Phosphatidsäure (Delon et al. 2004) binden kann. Da die GRK2 mit Hilfe ihrer *pleckstrin homology* (PH)-Domäne an Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) binden kann, und die Überexpression der GRK2-kd zu einer Inhibierung der SK1-Translokation führte, wurde überprüft, ob die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran und dabei insbesondere der Gehalt an PIP₂ einen Einfluss auf die SK1-Translokation haben könnte. Hierfür sollten zur Hemmung der Inositolmonophosphatase Lithiumchlorid (LiCl) und zur Hemmung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) LY294002 eingesetzt werden.

LiCl inhibiert verschiedene Phosphoinositolphosphatasen, darunter die Inositolpolyphosphat-1-phosphatase sowie die Inositolmonophosphatase, und folglich den Abbau des *second messengers* Inositoltrisphosphat (IP₃) über Inositolbisphosphat (IP₂) und Inositolmonophosphat (IP) zu Inositol (Chiu und Chuang 2010). Die Inkubation der Zellen mit LiCl führt folglich zu einer intrazellulären Akkumulation von IP, IP₂ und IP₃ und einer Verarmung an freiem Inositol, so dass die Neusynthese des Membranphospholipids PIP₂ unterbrochen wird. LY294002 hingegen führt durch Inhibition der PI3K zur Hemmung der PIP₃-Bildung (Milosevic et al. 2005; Vlahos et al. 1994). Außerdem sollte der Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein verwendet werden, denn der zelluläre PIP₂-Gehalt wird durch Tyrosinkinasen reguliert, und Genistein reduzierte deutlich den PIP₂-Gehalt unter anderem auch in HEK-293-Zellen (Rümenapp et al. 1998).

Es war bereits gezeigt worden, dass eine 20 minütige Inkubation mit Genistein keinen Einfluss auf die SK1-Translokation mit Carbachol hatte (Danneberg 2003, Dissertation). Auch LY294002 war nicht in der Lage gewesen, die SK1-Translokation prinzipiell zu hemmen (ter Braak et al. 2009). Für keinen der beiden Inhibitoren war jedoch ein möglicher Einfluss auf die Translokationsgeschwindigkeit der SK1 untersucht worden. Deshalb wurden hier den M₃-Rezeptor exprimierende HEK-293-Zellen mit YFP-mSK1 transfiziert und für 16 Stunden mit 10 mM LiCl, 50 µM LY294002 oder 100 µM Genistein vorinkubiert. Mittels konfokaler Mikroskopie wurde die Translokation der SK1 analysiert, wie in Abb. 7 dargestellt. Die Translokationshalbwertszeit wurde durch Anpassung von exponentiellen Kurven an die Abnahme der zytosolischen Fluoreszenz im Zeitverlauf nach der Stimulation bestimmt. Die Translokationshalbwertszeit der YFP-mSK1 nach Stimulation mit 100 µM Carbachol betrug in den unbehandelten Kontrollzellen $6,3 \pm 0,4$ s (n=30), nach Behandlung

mit Genistein $6,6 \pm 0,3$ s (n=29), nach Behandlung mit LiCl $5,8 \pm 0,3$ s (n=28), und nach Behandlung mit LY294002 $6,0 \pm 0,4$ s (n=25) (Mittelwerte \pm SEM; Abb. 8). Keiner der drei Inhibitoren hatte also einen signifikanten Effekt auf die Translokationsgeschwindigkeit der SK1.

Zusätzlich wurden HEK-293-Zellen direkt mit PIP₂ beladen. Dazu wurden die mit GFP-hSK1 transfizierten Zellen für fünf Minuten mit 5 μ M PI(4,5)P₂ di-C₁₆ und 5 μ M Histon H1-Protein als Lipidcarrier bzw. nur mit 5 μ M Histon H1-Protein (= Kontrollzellen) inkubiert. Die Carbachol-vermittelte (100 μ M) Translokationshalbwertszeit der GFP-hSK1 betrug in den Kontrollzellen $5,8 \pm 0,5$ s (n=17) und in den mit PIP₂ behandelten Zellen $6,2 \pm 0,5$ s (n=18) (jeweils Mittelwerte \pm SEM; Abb. 8). Die Behandlung mit PIP₂ hatte also ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Translokationsgeschwindigkeit der SK1. Folglich beeinflusst der PIP₂-Gehalt der Plasmamembran nicht die Geschwindigkeit der SK1-Translokation. Dies bedeutet jedoch nicht, dass Membranlipide keine Rolle in Bezug auf die Lokalisation der SK1 spielen. Es ist durchaus vorstellbar, dass die SK1 nach erfolgter Translokation an Membranlipide bindet und auf diese Weise permanent an der Membran lokalisiert ist.

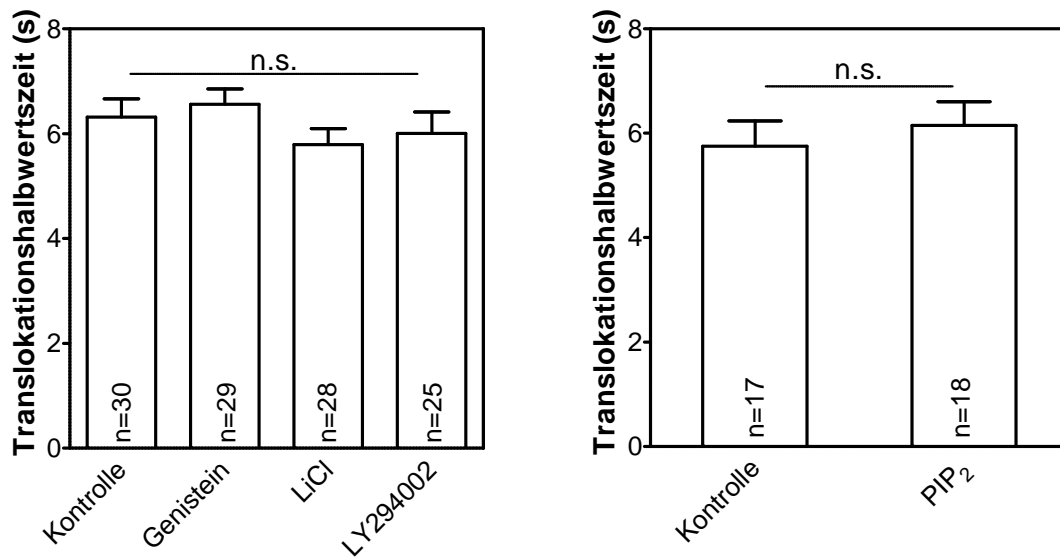


Abb. 8. Einfluss verschiedener Inhibitoren und von PIP₂ auf die Halbwertszeit der SK1-Translokation. (A) HEK-293-Zellen, die den M₃-Rezeptor stabil exprimieren, wurden mit YFP-mSK1 transfiziert und für 16 h mit 100 μM Genistein, 10 mM LiCl oder 50 μM LY294002 vorinkubiert. Anschließend wurde mit konfokaler Mikroskopie die Carbachol (100 μM)-induzierte Translokationshalbwertszeit der SK1 gemessen. (B) Die M₃-exprimierenden HEK-293-Zellen wurden mit GFP-hSK1 transfiziert und für 5 Minuten mit 5 μM PIP₂ in Gegenwart von Histon-Carrier beladen. Anschließend wurde die Carbachol (100 μM)-induzierte Translokationshalbwertszeit gemessen. Die Abbildungen zeigen Mittelwerte ± SEM.

3.3.3. Einfluss der SK1-Überexpression auf die $G\alpha_q$ -vermittelte Aktivierung der PLC β

Die verschiedenen Isoformen der PLC hydrolysieren das membranständige Lipid PIP₂ zu IP₃ und Diacylglycerol (DAG). IP₃ mobilisiert intrazelluläres Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum, während DAG verschiedene Isoformen der PKC stimuliert (Bunney und Katan 2011).

PLC β -Isoformen werden durch heterotrimere G-Proteine der $G\alpha_{q/11}$ -Familie aktiviert (Smrcka et al. 1991). Folglich sind sowohl die SK1 als auch die PLC β Effektoren von $G\alpha_{q/11}$. Dabei stellte sich die Frage, ob die G_q -vermittelte Aktivierung der SK1 indirekt über die PLC β und unterhalb davon gelegene Signalwege verlief, oder direkt parallel zur Aktivierung der PLC β erfolgte. Es war bereits gezeigt worden, dass die G_q -vermittelte Aktivierung der SK1 unabhängig von den durch die PLC β aktivierten Signalmolekülen bzw. Signalwegen wie DAG, PKC und Ca²⁺-Mobilisierung erfolgte (ter Braak et al. 2009). Hier sollte nun die Hypothese überprüft werden, dass die SK1 direkt durch $G\alpha_q$ angesteuert werden könnte. In diesem Fall sollten die beiden Effektoren, also PLC β und SK1, um die Aktivierung durch $G\alpha_q$ konkurrieren.

Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss der SK1-Überexpression auf die durch den M₃-Rezeptor stimulierte Inositolphosphat-Produktion untersucht. Dazu wurden die den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen mit GFP-hSK1 oder GFP (Abb. 9) bzw. mit einer katalytisch inaktiven Mutante der SK1 (SK1-G82D) oder Leervektor (Abb. 10) transfiziert und über Nacht mit [³H]-Inositol markiert. Vor der Stimulation wurden die Zellen für 10 Minuten mit 10 mM LiCl behandelt, um Inositolmonophosphatasen zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart von 10 mM LiCl für 20 min mit 100 μ M Carbachol oder Kontrollösung (H₂O) stimuliert. Nach Extraktion und Trennung von wässriger und organischer Phase sowie Aufreinigung der wässrigen Phase durch Anionenaustauschchromatographie konnte der Gehalt an [³H]-markierten Inositolphosphaten (IP, IP₂ und IP₃) durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt werden. Die Proteinkonzentration wurde mit unmarkierten, aber ansonsten identisch behandelten Zellschälchen bestimmt.

In unstimulierten GFP-exprimierenden Zellen lag der Gehalt an [³H]-markierten Inositolphosphaten bei 35,2 \pm 2,2 cpm/mg Protein, in unstimulierten GFP-hSK1-exprimierenden Zellen bei 37,2 \pm 1,5 cpm/mg Protein (jeweils Mittelwerte \pm SEM; n=9). Nach Stimulation mit Carbachol stieg der Gehalt an Inositolphosphaten in den GFP-exprimierenden Zellen auf 577,3 \pm 37,3 cpm/mg Protein und in den GFP-hSK1-überexprimierenden Zellen auf

513,2±27,6 cpm/mg Protein (jeweils Mittelwerte±SEM; n=9; p<0,05). Folglich hatte eine Überexpression der SK1 keinen Einfluss auf den basalen Inositolphosphat-Gehalt der Zellen, führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der durch den M₃-Rezeptor stimulierten Inositolphosphat-Produktion (Abb. 9).

Um auszuschließen, dass dieser Unterschied auf der katalytischen Aktivität der SK1 bzw. auf einem Einfluss von S1P beruhte, wurde zusätzlich der Einfluss der katalytisch inaktiven SK1-Mutante SK1-G82D untersucht. In unstimulierten mit Leervektor transfizierten Zellen lag der Gehalt an Inositolphosphaten bei 23,5±4,1 cpm/mg Protein, bei unstimulierten SK1-G82D-exprimierenden Zellen bei 18,7±3,1 cpm/mg Protein (jeweils Mittelwerte±SEM; n=8). Nach Stimulation mit Carbachol stieg der Gehalt an Inositolphosphaten in den mit Leervektor transfizierten Zellen auf 361,8±35,3 cpm/mg Protein und in den SK1-G82D-exprimierenden Zellen auf 295,8±33,4 cpm/mg Protein (jeweils Mittelwerte±SEM; n=8; p=0,01).

Folglich führte die Überexpression der SK1 nach Stimulation des G_q-gekoppelten M₃-Rezeptors zu einer reduzierten Aktivierung der PLCβ, und zwar unabhängig davon, ob die verwendete SK1 katalytisch aktiv war (Abb. 9). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die SK1 mit der PLCβ um Gα_q konkurriert, weshalb eine Überexpression der SK1 zur Verminderung der PLC-Aktivierung durch den M₃-Rezeptor führt.

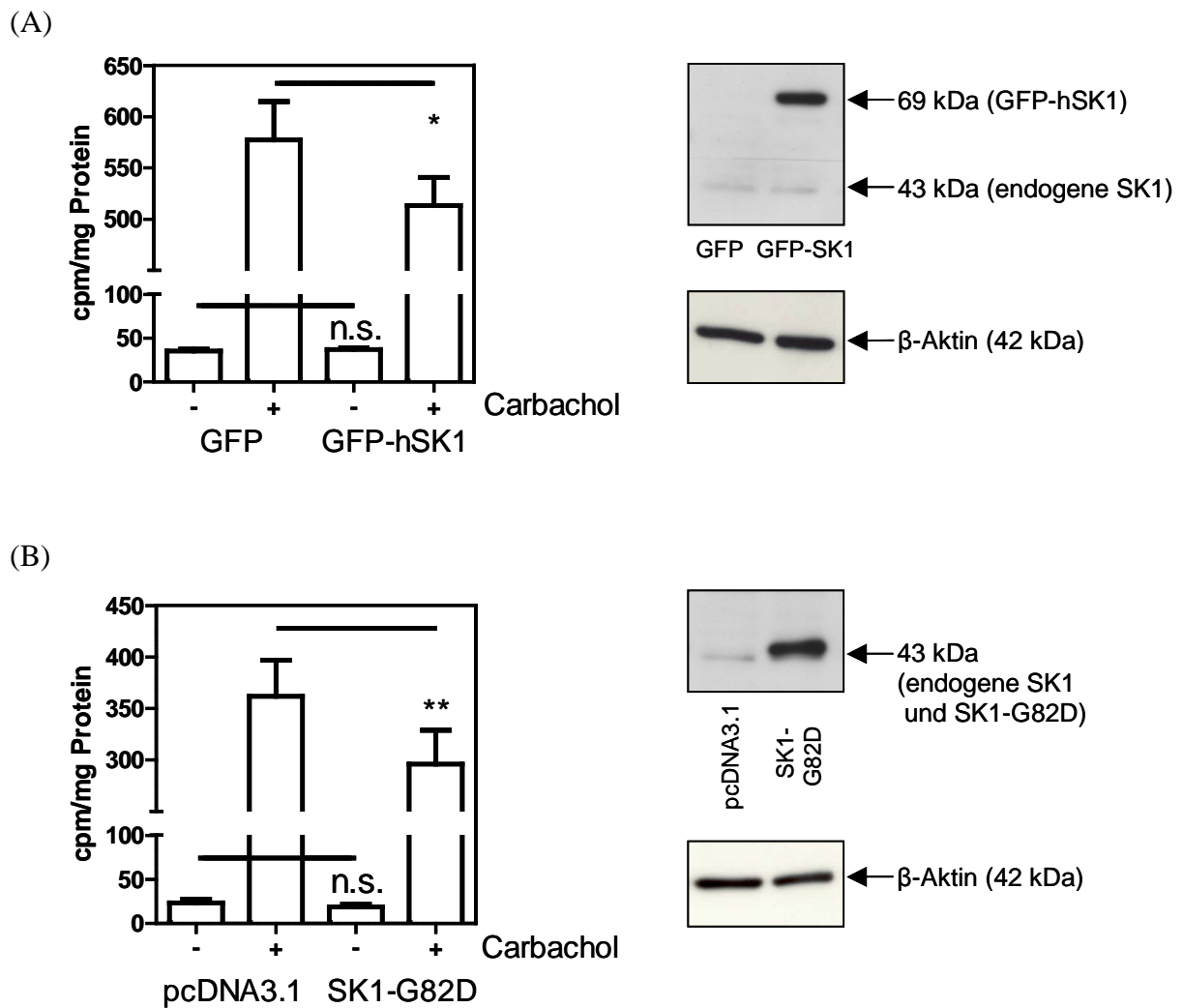


Abb. 9. Einfluss der SK1-Überexpression auf die durch den M₃-Rezeptor stimulierte Inositolphosphat-Bildung. HEK-293-Zellen, die den M₃-Rezeptor stabil exprimieren, wurden mit GFP-hSK1 oder GFP (A) bzw. mit einer katalytisch inaktiven Mutante der SK1 (SK1-G82D) oder Leervektor (pcDNA3.1) (B) transfiziert. Der Gesamtgehalt an Inositolphosphaten (IP₃, IP₂, IP) wurde in mit [³H]-Inositol-markierten Zellen gemessen, die für 20 Minuten mit 100 μM Carbachol in Anwesenheit von LiCl stimuliert worden waren. Die Expression der jeweiligen SK1-Konstrukte wurde im Western Blot mit anti-SK1-Antikörpern überprüft.

Angegeben sind Mittelwerte±SEM; n=9 Experimente (A); n=8 Experimente (B). n.s., nicht signifikant; *, p<0,05; **, p=0,01 im gepaarten t-Test.

3.3.4. Abhängigkeit der durch den B₂-Rezeptor stimulierten SK1-Translokation von Gα_q

Vor Beginn dieser Arbeit war gezeigt worden, dass die Expression von konstitutiv aktiven Gα_q- und Gα₁₁-Mutanten, aber nicht von konstitutiv aktivem Gα_i, Gα₁₂ oder Gα₁₃ eine dauerhafte Translokation der SK1 an die Plasmamembran induzierte (ter Braak et al. 2009). Um die Rolle von Gα_q bei der SK1-Translokation weiter zu analysieren, untersuchten wir MEFs, die sowohl in Gα_q als auch in seinem Homolog Gα₁₁ doppelt defizient waren (Gα_{q/11}^{-/-}-MEFs) (Offermanns et al. 1998). Diese Zellen wurden mit dem G_q-gekoppelten Bradykinin B₂-Rezeptor transfiziert und mit Bradykinin stimuliert, um die SK1-Translokation auszulösen. In Gα_{q/11}^{-/-}-MEFs, die mit dem B₂-Rezeptor und hSK1-Cerulean oder mit B₂-Rezeptor und YFP-mSK1 cotransfiziert worden waren, konnte nach Stimulation mit 10 μM Bradykinin keine Translokation der SK1 beobachtet werden (Abb. 10). Wenn die Gα_{q/11}^{-/-}-MEFs jedoch zusätzlich Gα_q-YFP exprimierten, löste die Stimulation des B₂-Rezeptor eine Translokation der hSK1-Cerulean aus (Abb. 10). Auch in Zellen, die mit B₂-Rezeptor, YFP-mSK1 und Gα_q-Wildtyp transfiziert worden waren, war die SK1-Translokation deutlich zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen zunächst, dass für die durch den B₂-Rezeptor stimulierte SK1-Translokation die Expression von Gα_q benötigt wird. Zusammen mit den Beobachtungen, die mit den konstitutiv aktiven G-Protein α-Untereinheiten gemacht worden waren, legen diese Daten nahe, dass die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren induzierte SK1-Translokation über Gα_q verläuft.

Als nächstes wurde der Einfluss verschiedener Gα_q-Mutanten auf die Translokationshalbwertszeit der YFP-mSK1 in Gα_{q/11}^{-/-}-MEFs nach Stimulation des B₂-Rezeptors mit Bradykinin untersucht. Alle verwendeten Gα_q-Mutanten waren in der Lage, die Bradykinin-induzierte SK1-Translokation in Gα_{q/11}^{-/-}-MEFs wieder herzustellen (Abb. 11). Die Expression der Gα_q-W263D-Mutante führte allerdings zu einer signifikant verlangsamten SK1-Translokation (t_{1/2} 10,8±1,1 s; Mittelwert±SEM; n=18), während andere Gα_q-Mutanten (Y261N: t_{1/2} 7,9±1,4 s, n=17; D321A: t_{1/2} 4,1±0,5 s, n=14; und Y356K: t_{1/2} 4,5±0,5 s, n=17; Mittelwerte±SEM) eine SK1-Translokation mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie Gα_q-Wildtyp (t_{1/2} 5,8±0,6 s, n=31) vermittelten (Abb. 11). Die durch die Gα_q-T257E-Mutante induzierte SK1-Translokation war erst nach 2 bis 3 Minuten sichtbar. Deswegen wurde für diese Mutante keine Translokationshalbwertszeit bestimmt. Folglich führte die Mutation bestimmter Aminosäuren von Gα_q zu einer verlangsamten SK1-Translokation.

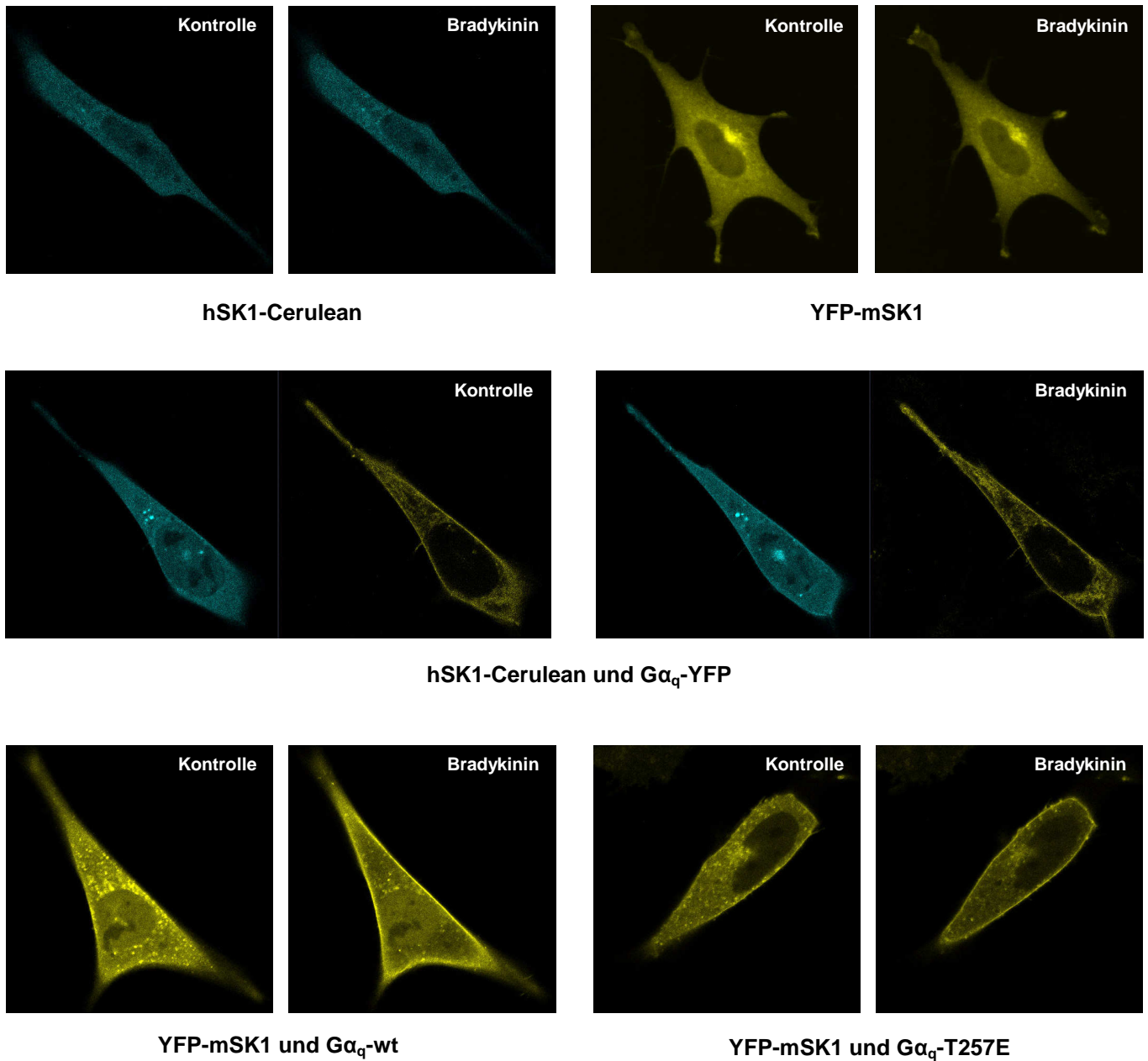


Abb. 10. Abhängigkeit der durch den B₂-Rezeptor stimulierten SK1-Translokation von Gα_q. Gα_{q/11}-defiziente MEFs wurden wie angegeben mit dem Bradykinin B₂-Rezeptor und verschiedenen Konstrukten der SK1 bzw. von Gα_q cotransfiziert: hSK1-Cerulean oder YFP-mSK1 (erste Reihe), hSK1-Cerulean und Gα_q-YFP (zweite Reihe), YFP-mSK1 und Gα_q-wt oder Gα_q-T257E (dritte Reihe). Mittels konfokaler Mikroskopie wurde die SK1-Translokation nach Stimulation mit 10 μM Bradykinin analysiert. Gezeigt sind Bilder jeweils vor und ca. 1 Minute nach der Stimulation mit Bradykinin. Die Experimente wurden mindestens dreimal mit gleichem Ergebnis wiederholt.

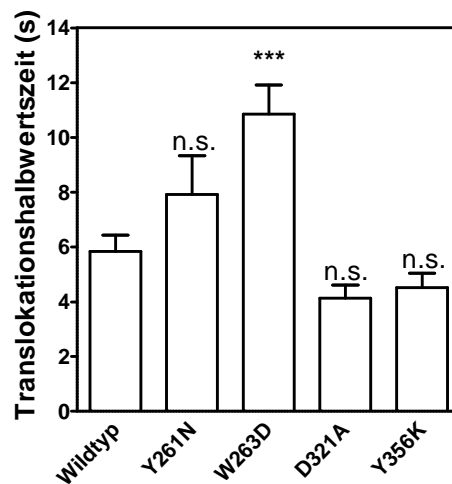


Abb. 11. Einfluss verschiedener $G\alpha_q$ -Mutanten auf die Translokationsgeschwindigkeit der SK1. $G\alpha_{q11}$ -defiziente MEFs wurden mit dem B_2 -Rezeptor, der YFP-mSK1 und $G\alpha_q$ -Wildtyp oder verschiedenen $G\alpha_q$ -Mutanten cotransfiziert. Mittels konfokaler Mikroskopie wurde die Translokation der SK1 nach Stimulation mit 10 μ M Bradykinin analysiert. Die Translokationshalbwertszeit wurde bestimmt, indem exponentielle Kurven an den Zeitverlauf der zytosolischen Fluoreszenzintensität angepasst wurden. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; n=31 (Wildtyp); n=14-18 ($G\alpha_q$ -Mutanten). n.s., nicht signifikant; ***, $p < 0,001$ im t-Test im Vergleich zum Wildtyp.

3.3.5. Kopplung des S1P₁-Rezeptors an die SK1 durch eine Chimäre aus G α _i und G α _q

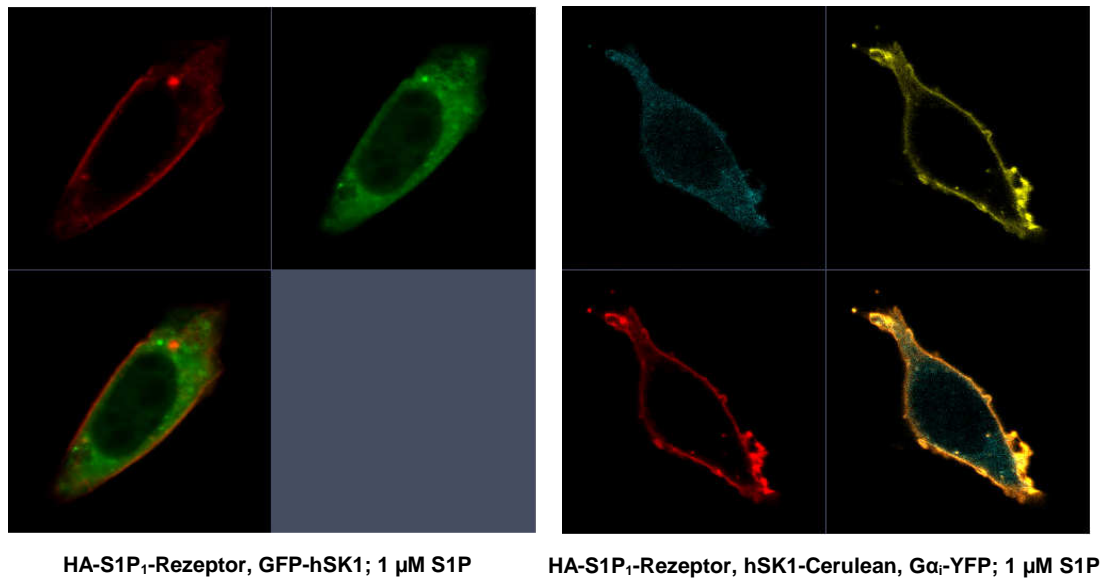
Vorarbeiten hatten gezeigt, dass im Gegensatz zu G_q-gekoppelten Rezeptoren wie M₃- und B₂-Rezeptoren G_i-gekoppelte Rezeptoren wie der M₂- oder der S1P₁-Rezeptor nicht in der Lage waren, eine SK1-Translokation zu induzieren (ter Braak et al. 2009). Auch in den G $\alpha_{q/11}$ ^{-/-}-MEFs sollte nun überprüft werden, ob sich über G_i-Signalwege eine SK1-Translokation auslösen lassen könnte. MEFs exprimieren in variablem Ausmaß die S1P-Rezeptoren S1P₁, S1P₂ und S1P₃ (Goparaju et al. 2005). Während der S1P₁-Rezeptor ausschließlich an G_{i/0} koppelt, aktivieren S1P₂ und S1P₃ auch G_{q/11} und G_{12/13} (Chun et al. 2010). Deshalb wurde der S1P₁-Rezeptor überexprimiert, was zur verstärkten Aktivierung von G_i nach Stimulation der Zellen mit S1P führen sollte. Dies schließt eine S1P_{2/3}-vermittelte Aktivierung von G_{q/11} und G_{12/13} allerdings nicht aus. Zunächst wurden die G $\alpha_{q/11}$ ^{-/-}-MEFs mit dem HA-markierten S1P₁-Rezeptor und GFP-hSK1 cotransfiziert und analysiert. Die Expression des HA-markierten Rezeptors wurde nach Fixierung der Zellen in 4 %iger Paraformaldehydlösung mit einem Anti-HA-Antikörper und einem Alexa Fluor[®] 555-markierten Zweitantikörper nachgewiesen. Eine Stimulation mit 1 μ M S1P führte nicht zur SK1-Translokation (Abb. 12). Auch die Kombination aus S1P₁-Rezeptor, hSK1-Cerulean und G α _i-YFP führte nach Stimulation mit 1 μ M S1P nicht zur SK1-Translokation.

Schließlich wurde versucht, durch Verwendung einer Chimäre aus G α _i und G α _q den S1P₁-Rezeptor an die SK1 zu koppeln. Die hier verwendete Chimäre G α_{i5q} -G66D basiert auf der Sequenz von G α _q, besitzt aber C-terminal fünf Aminosäuren von G α _i und in der Linker I-Region eine Punktmutation. Diese Chimäre war u.a. entwickelt worden, um das *high-throughput screening* von Liganden an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu erleichtern, denn sie verbindet G_i-gekoppelte Rezeptoren mit G_q-Effektoren wie der PLC β , deren Aktivierung über den nachfolgenden [Ca²⁺]_i-Anstieg einfach zu messen ist (Kostenis et al. 2005b). Beide beschriebenen Mutationen zusammen führen zu einer erhöhten Promiskuitivität der Chimäre in Bezug auf den Rezeptor und einer stärkeren Aktivierung der nachgeschalteten PLC β als die jeweilige einzelne Mutation (Kostenis et al. 2005a). Um eine mögliche Kopplung der Chimäre an die SK1 zu untersuchen, wurden G $\alpha_{q/11}$ ^{-/-}-MEFs mit dem S1P₁-Rezeptor, GFP-hSK1 und G α_{i5q} -G66D cotransfiziert und die SK1-Translokation nach Stimulation mit 1 μ M S1P analysiert. Wie in Abb. 12 gezeigt, induzierte die Stimulation mit S1P unter diesen Bedingungen tatsächlich eine Translokation der SK1. Dabei ist zu bedenken, dass die Chimäre neben dem S1P₁-Rezeptor auch die endogenen S1P₂- und S1P₃-Rezeptoren

stärker mit G_q -Signalwegen zu verknüpfen vermag, so dass möglicherweise eine gemeinsame Wirkung der drei Rezeptoren beobachtet wurde.

Diese Ergebnisse bestätigen die Vorarbeiten, indem sie zeigen, dass G_i -gekoppelte Rezeptoren nicht in der Lage sind, eine SK1-Translokation zu induzieren. Eine $G\alpha_{i/q}$ -Chimäre, welche diesen Rezeptoren ermöglicht, effektiver als über G_i allein die PLC β zu aktivieren, ermöglichte auch eine Translokation der SK1, was nochmal die Bedeutung von $G\alpha_q$ für die Ansteuerung der SK1 belegt.

(A)



(B)

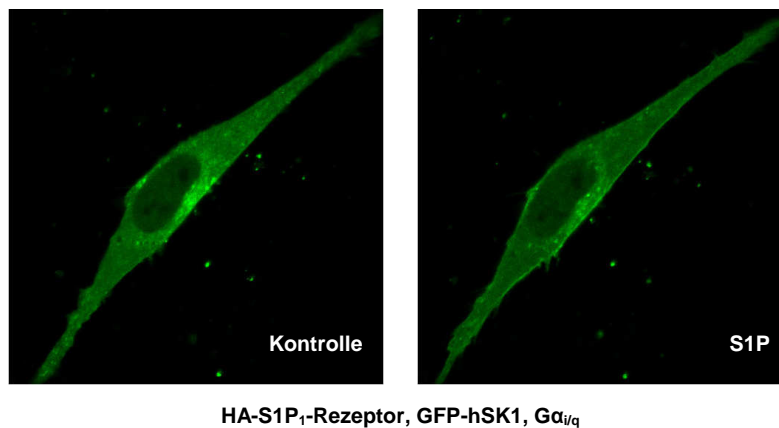


Abb. 12. Vermittlung der SK1-Translokation nach Stimulation des S1P₁-Rezeptors durch eine Chimäre aus Gα_i und Gα_q. (A) *Gα_{q/11}*^{-/-}-MEFs waren entweder mit dem HA-markierten S1P₁-Rezeptor und GFP-hSK1, oder mit HA-S1P₁-Rezeptor, hSK1-Cerulean und Gα_i-YFP transfiziert worden. Die Abbildungen zeigen die Zellen nach Stimulation mit 1 μM S1P für etwa 1 Minute. Die Expression des HA-getaggten Rezeptors wurde nach Fixierung der Zellen in 4 %iger Paraformaldehydlösung mit einem Anti-HA-Antikörper und einem Alexa Fluor[®] 555-markierten Zweitantikörper nachgewiesen. (B) *Gα_{q/11}*^{-/-}-MEFs waren mit HA-S1P₁-Rezeptor, GFP-hSK1 und Gα_{5q}-G66D (Gα_{i/q}) transfiziert worden. Die Abbildung zeigt eine Zelle vor und etwa 1 Minute nach Stimulation mit 1 μM S1P. Gezeigt sind repräsentative Abbildungen, die mindestens dreimal mit ähnlichem Resultat wiederholt worden waren.

3.3.6. Reinigung der SK1 aus E. coli

Für die folgenden Versuche wurde die humane SK1 (GenBank: AF200328.1) mittels ligationsunabhängiger Klonierung (LIC) in den pMCSG9-Vektor kloniert (Donnelly et al. 2006). Dieser Vektor ist für die bakterielle Expression geeignet und generiert ein N-terminal *getaggetes* His6-MBP-Fusionsprotein. Durch Verwendung des *MBP-tags* wird die Löslichkeit des Proteins erhöht. Der genaue Aufbau des Vektors ist in Abb. 13 abgebildet. Das erhaltene Plasmid wurde durch Elektroporation in den E. coli-Stamm Rosetta transferiert. Die Expression des His6-MBP-SK1-Proteins wurde durch IPTG induziert, und das Protein wurde aus dem Bakterienlysat durch Amylose-Affinitätschromatographie und Ni⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Nallamsetty und Waugh 2007). Wie in Abb. 13 zu sehen, war das erhaltene His6-MBP-SK1-Protein nach der Aufreinigung von hoher Reinheit. Das Fusionsprotein hatte ein Molekulargewicht von 84 kDa, was mit den kombinierten Molekulargewichten von *MBP-tag*, *His-tag* und SK1 übereinstimmt.

Die katalytische Aktivität der SK1 wurde in einem Aktivitätsassay ermittelt, bei dem das fluoreszierende Sphingosinderivat NBD-Sphingosin verwendet wurde. NBD-Sphingosin und NBD-S1P wurden auf einer DC-Platte chromatographisch getrennt und die Fluoreszenz bestimmt. Die Umsetzung von NBD-Sph zu NBD-S1P war sowohl von der eingesetzten Menge an SK1 (1 bis 10 µg Protein) als auch von der Inkubationszeit (30 bis 120 min) abhängig (Abb. 13).

Wie erwartet war die Löslichkeit des erhaltenen Proteins aufgrund des *MBP-tags* relativ hoch. Die Spaltung des His6-MBP-Fusionsproteins mittels einer TEV-Protease führte allerdings dazu, dass das SK1-Protein teilweise ausfiel und die katalytische Aktivität herabgesetzt wurde. Deshalb wurde für die folgenden Experimente auf die Spaltung des Proteins nach der Aufreinigung verzichtet.

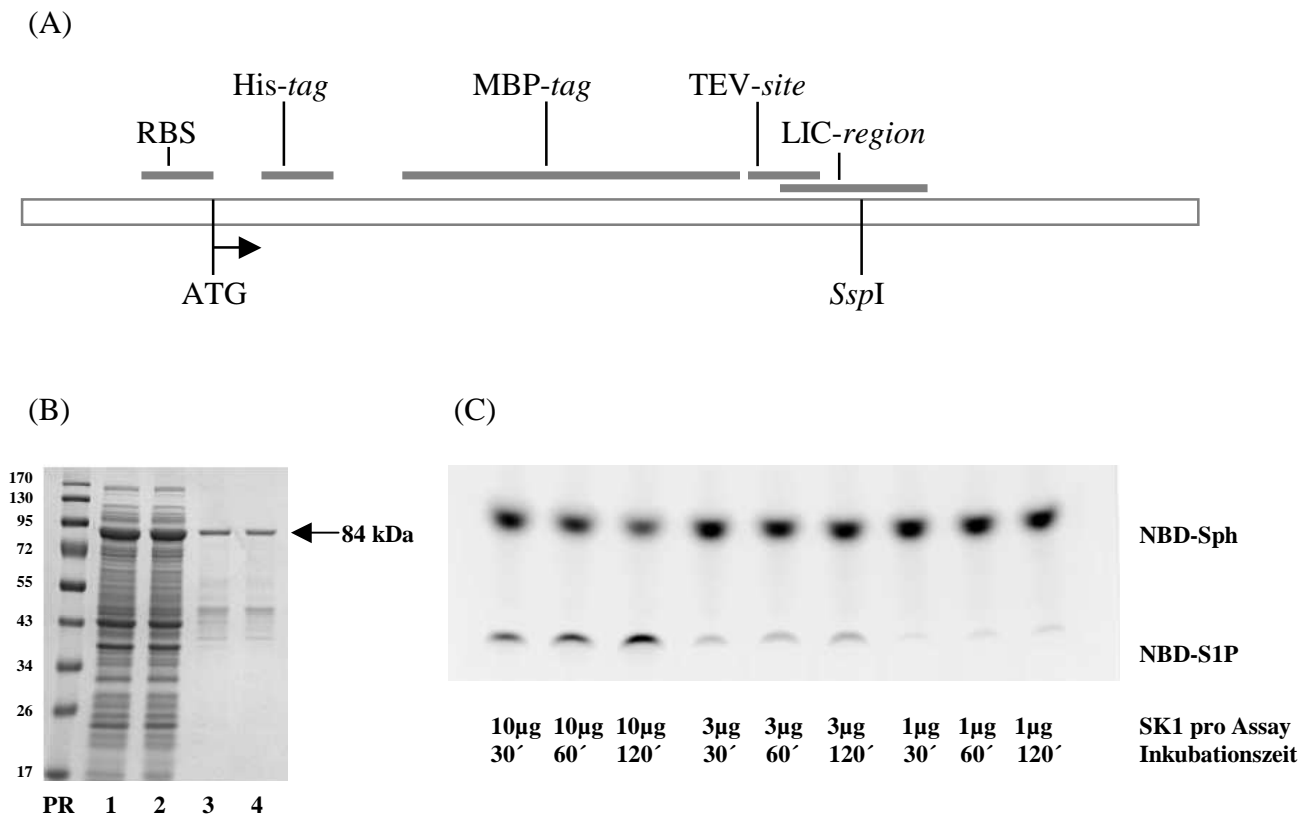


Abb. 13. Reinigung der SK1 aus *E. coli* und Nachweis der katalytischen Aktivität. (A) Vektorkarte des verwendeten pMCSG9-Vektors (nach Donnelly et al. 2006). Klonierung an der LIC-Stelle generiert ein N-terminal *getaggt*es His6-MBP-Fusionsprotein. Die humane SK1 wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor kloniert. Das SK1-Protein wurde anschließend in *E. coli* exprimiert und durch Amylose-Affinitätschromatographie und Ni⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt. (B) Bakterienlysat und aufgereinigtes Protein wurden elektrophoretisch in einem 10 %igen Polyacrylamid-Gel getrennt und mit Coomassieblau angefärbt. Die Bahnen waren wie folgt beladen worden: PR, *PageRuler Prestained Protein Ladder*; Bahn 1 und 2, Bakterienlysat; Bahn 3 und 4, aufgereinigtes hSK1-Protein. Das His6-MBP-SK1-Protein hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 84 kDa. (C) Nachweis der katalytischen Aktivität des His6-MBP-SK1-Proteins. Die enzymatische Umsetzung von NBD-Sphingosin zu NBD-S1P wurde wie angegeben mit 1 µg, 3 µg oder 10 µg Protein und Inkubationszeiten von 30, 60 oder 120 Minuten analysiert. Die Auftrennung erfolgte per Dünnschichtchromatographie, die Auswertung erfolgte fluorometrisch. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment, das mindestens dreimal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt wurde.

3.3.7. Funktionelle Charakterisierung der bakteriell exprimierten hSK1

Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits die SK1 und die SK2 gereinigt und funktionell charakterisiert (Liu et al. 2000; Nava et al. 2000; Pitson et al. 2000). Daher wurde mittels *in vitro*-Kinaseassay untersucht, ob die hier in *E. coli* exprimierte hSK1 die gleichen Eigenschaften aufwies.

In einem ersten Schritt wurde die Wirkung von Mg^{2+} auf die Aktivität des His6-MBP-hSK1-Fusionsproteins überprüft. Die SK1-Aktivität stieg dabei konzentrationsabhängig durch Mg^{2+} -Zugabe an. Gegenüber der Kontrolle führten 0,2 mM bzw. 0,5 mM Mg^{2+} zu einer signifikanten Zunahme der SK1-Aktivität um ungefähr den Faktor 2,5, während 0,05 mM Mg^{2+} und 0,1 mM Mg^{2+} keinen signifikanten Einfluss auf die SK1-Aktivität hatten (Abb. 14A). In einem zweiten Schritt wurde der Effekt von Triton X-100 auf die Aktivität des His6-MBP-hSK1-Fusionsproteins ermittelt. Die SK1-Aktivität stieg nach Zugabe von 0,01 % Triton X-100 signifikant an, während 0,05 % Triton X-100 keinen Einfluss auf die Aktivität hatte und 0,1 % sowie 0,5 % Triton X-100 zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität führten (Abb. 14B). Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedener bivalenter Kationen auf die SK1-Aktivität untersucht. Mg^{2+} führte wie oben beschrieben wieder zu einer signifikanten Zunahme der SK1-Aktivität (bei 1 mM um etwa den Faktor 8). 1 mM Co^{2+} und Mn^{2+} erhöhten ebenfalls signifikant die Aktivität (um etwa den Faktor 5 im Falle von Co^{2+} und um etwa den Faktor 11 im Falle von Mn^{2+}), während 1 mM Cu^{2+} und Zn^{2+} die Aktivität signifikant reduzierten. Fe^{2+} hatte in einer Konzentration von 1 mM keinen Einfluss auf die Aktivität der SK1.

Desweiteren wurde der Einfluss verschiedener Lipide auf die SK1-Aktivität gemessen. L- α -Phosphatidylserin und 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol führten in einer Konzentration von 10 μ M zu keinem signifikanten Anstieg der SK1-Aktivität. Auch der PKC-Lipidaktivator (0,05 mg/ml Phosphatidylserin und 0,005 mg/ml Diacylglycerol, 2,5 mM β -Glycerolphosphat, 0,1 mM Natriumorthovanadat, 0,1 mM Dithiothreitol, 0,1 mM $CaCl_2$; jeweils Endkonzentrationen) veränderte die SK1-Aktivität nicht signifikant.

Ein potenter Inhibitor der SK1 ist SKI-II, welches relativ selektiv die SK1 inhibiert (French et al. 2003). Eine Konzentration von 10 μ M SKI-II führte zu einer schwachen, aber dennoch signifikanten Reduktion der SK1-Aktivität um ~25 %. Zusätzlich wurde der Effekt von Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon) auf die SK1-Aktivität untersucht. In einer Konzentration von 10 μ M hatte Genistein allerdings keinen inhibierenden Effekt auf die SK1-Aktivität.

Die Aktivität des His6-MBP-SK1-Fusionsproteins wird folglich durch die bivalenten Kationen Co^{2+} , Mn^{2+} und Mg^{2+} gesteigert bzw. durch Cu^{2+} und Zn^{2+} reduziert. Lipide wie L- α -Phosphatidylserin und 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol haben keinen Einfluss auf die SK1-Aktivität. SKI-II inhibiert ebenfalls signifikant die SK1-Aktivität, während Genistein keinen Effekt zeigt.

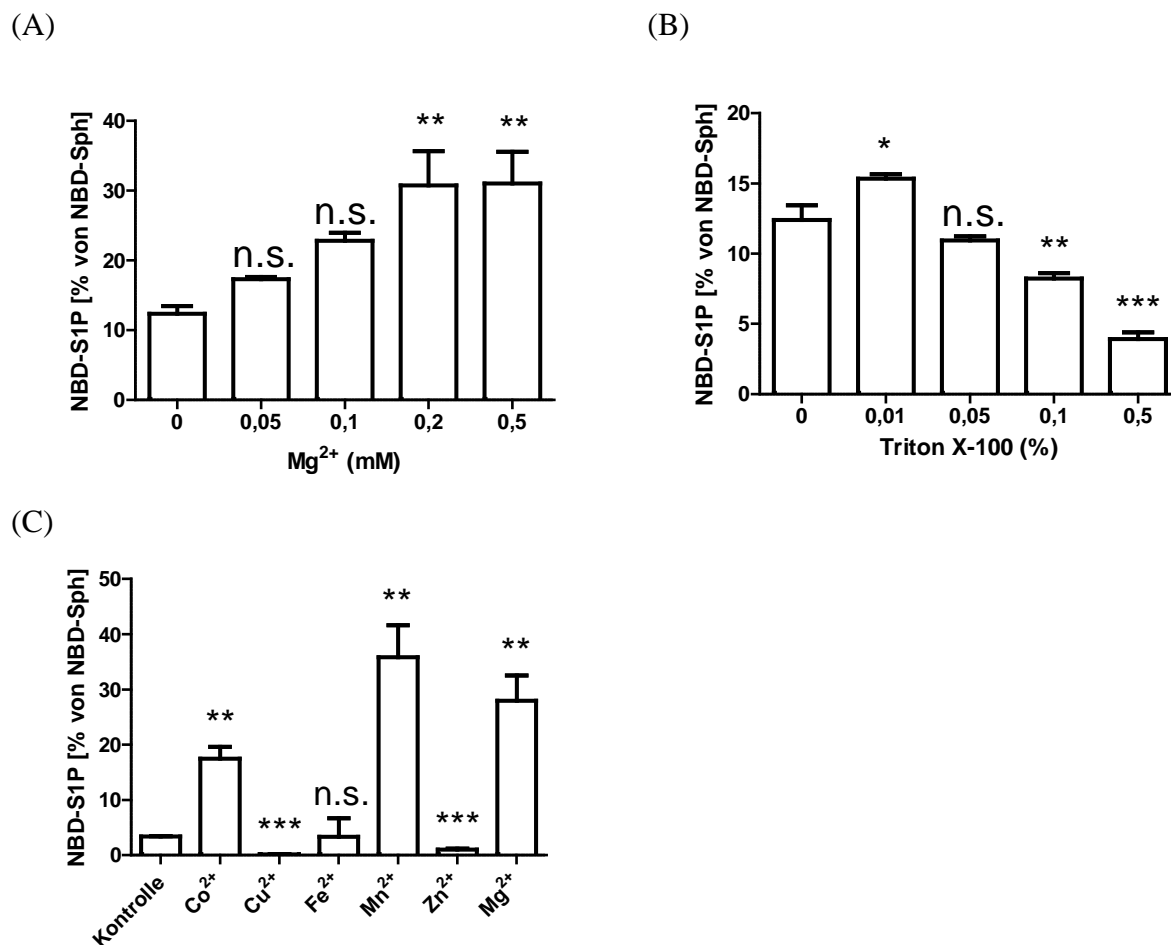


Abb. 14. Einfluss von Mg²⁺ und anderen zweiwertigen Kationen sowie von Triton X-100 auf die katalytische Aktivität des in *E. coli*-exprimierten His6-MBP-hSK1-Fusionsproteins. Der Aktivitätsassay beruhte wie in Abb. 13C gezeigt auf der Umsetzung von NBD-Sphingosin zu NBD-S1P. (A) und (B): Konzentrationsabhängiger Effekt von Mg²⁺ und Triton X-100 auf die SK1-Aktivität. 1 µg Fusionsprotein wurden in Gegenwart von den angegebenen Konzentrationen von Mg²⁺ bzw. Triton X-100 für 30 Minuten mit NBD-Sphingosin inkubiert. (C) Effekt von verschiedenen bivalenten Kationen auf die SK1-Aktivität. Die Metallionen wurden in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt. 1 µg Fusionsprotein wurden in Gegenwart der Metallionen für 30 Minuten mit NBD-Sphingosin inkubiert.

Alle Werte sind Mittelwerte±SEM aus jeweils drei unabhängigen Experimenten (n.s., nicht signifikant; *, p<0.05, **, p<0.01; ***, p<0.001 im t-Test vs. Kontrolle).

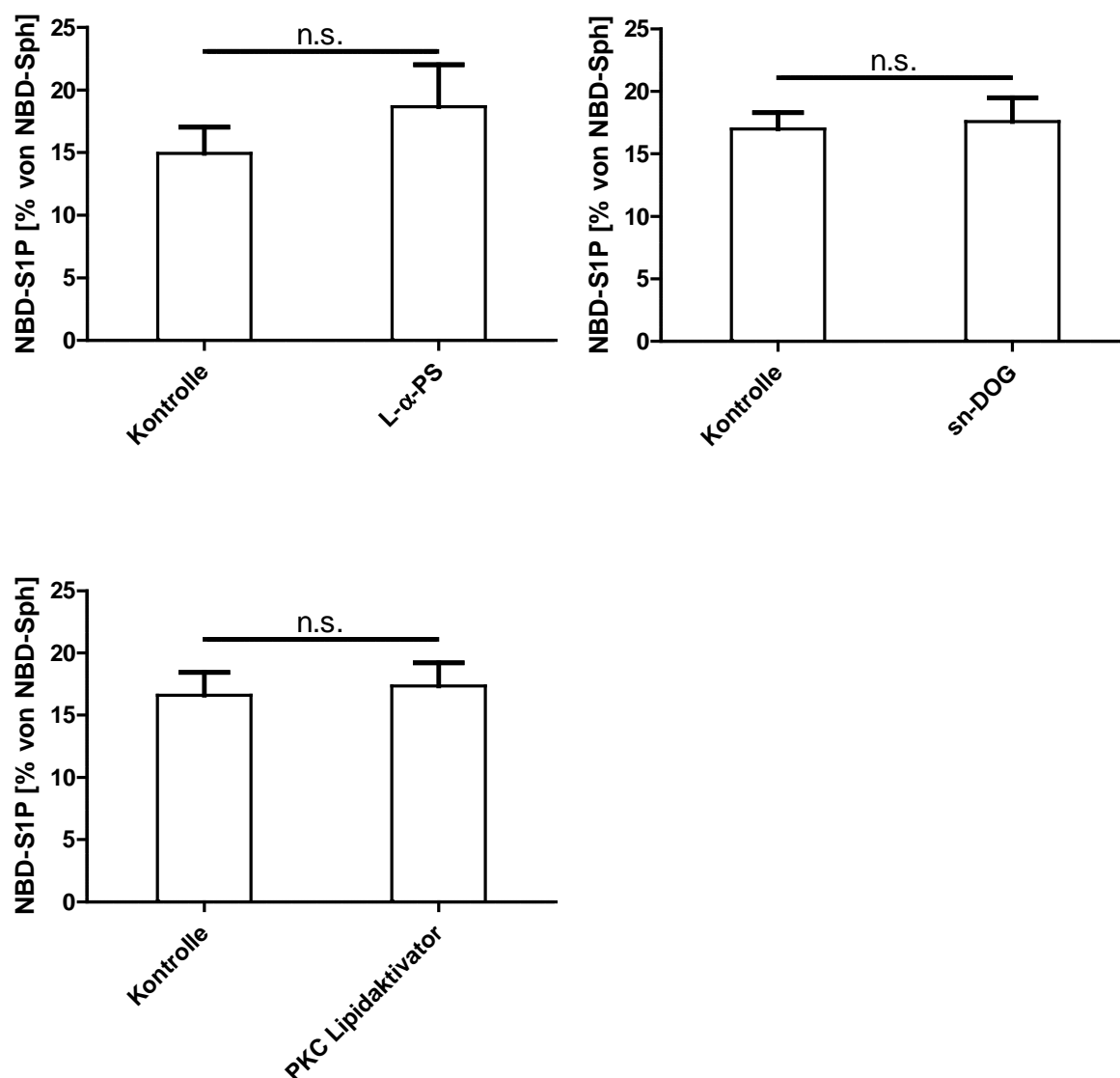


Abb. 15. Einfluss verschiedener Lipide auf die katalytische Aktivität des in *E. coli*-exprimierten His6-MBP-hSK1-Fusionsproteins. Der Aktivitätsassay beruhte wie in Abb. 13C gezeigt auf der Umsetzung von NBD-Sphingosin zu NBD-S1P. Die Wirkung der folgenden Lipide wurde untersucht: L- α -Phosphatidylserin (L- α -PS; 10 μ M), 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol (DOG; 10 μ M), PKC-Lipidaktivator (0,05 mg/ml Phosphatidylserin und 0,005 mg/ml Diacylglycerol, 2,5 mM β -Glycerolphosphat, 0,1 mM Natriumorthovanadat, 0,1 mM Dithiothreitol, 0,1 mM CaCl₂, jeweils Endkonzentrationen). 1 μ g Fusionsprotein wurden in Gegenwart der Lipide für 30 Minuten mit NBD-Sphingosin inkubiert. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils drei unabhängigen Experimenten (n.s., nicht signifikant im t-Test vs. Kontrolle).

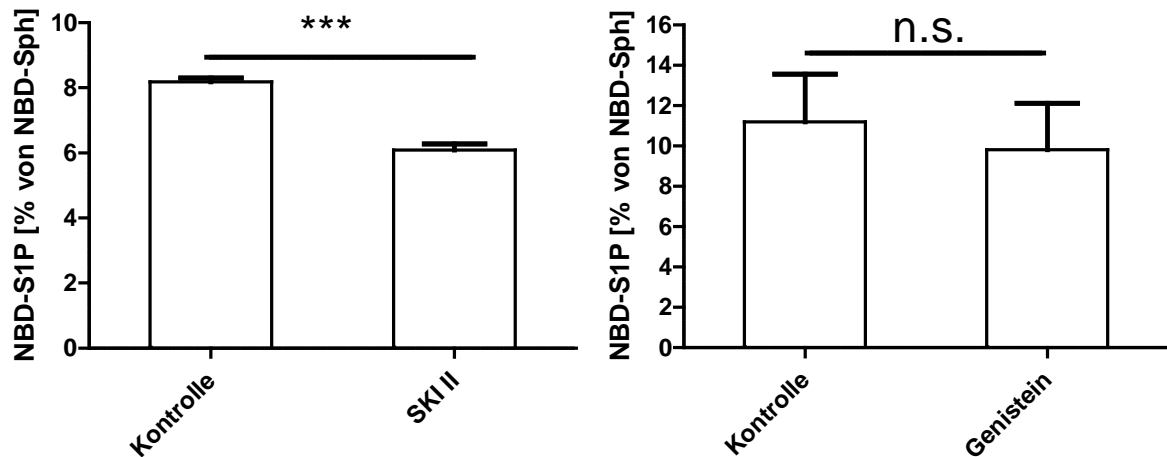


Abb. 16. Einfluss von SKI-II und Genistein auf die katalytische Aktivität des in *E. coli*-exprimierten His6-MBP-hSK1-Fusionsproteins. Der Aktivitätsassay beruhte wie in Abb. 13C gezeigt auf der Umsetzung von NBD-Sphingosin zu NBD-S1P. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

1 μ g Fusionsprotein wurden in Gegenwart der Lipide für 30 Minuten mit NBD-Sphingosin inkubiert. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils drei unabhängigen Experimenten (n.s., nicht signifikant; ***, $p < 0,001$; im t-Test vs. Kontrolle)

3.3.8. Untersuchung der direkten Interaktion von SK1 und $G\alpha_q$ mit optischer Thermophorese

Die optische Thermophorese bzw. *microscale thermophoresis* (MST) nutzt die Eigenschaft von Molekülen aus, innerhalb eines Temperaturgradienten typischerweise vom Ort höherer Temperatur zum Ort niedriger Temperatur zu wandern (Duhr und Braun 2006). Der Temperaturgradient wird innerhalb einer Glaskapillare durch einen Infrarot-Laser erzeugt. Um die Interaktion von zwei Molekülen zu testen, wird eines der beiden Moleküle mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie bspw. NT-647 markiert, und die Bewegung dieses Moleküls durch Messung der Fluoreszenzverteilung innerhalb der Kapillare verfolgt. Die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Moleküls ist in allen Kapillaren einer Versuchsreihe konstant, während die Konzentration des unmarkierten, putativen Bindungspartners verändert wird. Thermophorese, d. h. die Wanderung der Moleküle innerhalb eines Temperaturgradienten, ist sehr empfindlich für Änderungen in der Größe, der Ladung oder der Hydratationshülle von Molekülen und daher gut für bioanalytische Aufgaben geeignet (Jerabek-Willemsen et al. 2011). So kann es zur Messung von Protein-Protein-Interaktionen und zur Bestimmung der Affinität von Proteinen verwendet werden (Wienken et al. 2010).

Zur Auswertung wird das Verhältnis aus dem Fluoreszenzsignal nach dem Einschalten des Infrarot-Lasers und dem basalen Fluoreszenzsignal (Infrarot-Laser aus) gebildet, das Verhältnis für die geringste Konzentration des unmarkierten Moleküls als Referenzwert (100 % = Basalwert) angenommen, und alle normierten Verhältnisse gegen den Logarithmus der Konzentration des unmarkierten Bindungspartner aufgetragen. Falls sich hierbei eine sigmoidale Kurve ergibt, zeigt dies eine direkte Interaktion zwischen den eingesetzten Molekülen an. Der Wendepunkt entspricht der Dissoziationskonstante K_D . Im Falle, dass zwei Moleküle nicht miteinander interagieren, erhält man eine Gerade, die parallel zur Konzentrationsachse verläuft.

Um die Interaktion zwischen $G\alpha_q$ -Protein und SK1-Protein mittels MST zu messen, wurde das His6-MBP-hSK1-Fusionsprotein mit dem Fluoreszenzfarbstoff NT647 nach Herstellervorgabe markiert. Im Folgenden wird das markierte Molekül mit einem * gekennzeichnet (hSK1* bzw. $G\alpha_q^*$).

Für die SK1 wurde bereits gezeigt, dass sie mit dem TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor-2 (TRAF2) interagiert, weswegen TRAF2 als Positivkontrolle verwendet wurde (Alvarez et al. 2010; Xia et al. 2002). *TRAF family member-associated NF- κ B activator* (TANK), auch i-TRAF (*TRAF interacting protein*) genannt, ist ein bifunktionelles Adapterprotein, das mit

TRAF-Proteinen interagiert (Rothe et al. 1996). Das in den folgenden Versuchen verwendete N-terminale Fragment (Aminosäuren 1-119) führt zu einer Aktivierung von NF- κ B, wohingegen die C-terminale Domäne dieser Aktivierung entgegenwirkt (Zhang et al. 2010). Eine Interaktion mit der SK1 wurde bisher nicht beschrieben. TANK wurde daher als Negativkontrolle verwendet.

Die Ergebnisse der MST-Messung zeigen, dass hSK1* wie erwartet mit TRAF2, allerdings nicht mit TANK interagiert (Abb. 17). Thermophorese bietet auch die Möglichkeit der Affinitätsbestimmung zwischen zwei Molekülen. Nach der Markierung wurde die Konzentration der hSK1* in der Kapillare bei einer Ausbeute von 100 % mit 112 nM errechnet, die reale Ausbeute liegt laut Hersteller bei 60-90 %. Der k_D -Wert beträgt für die Interaktion mit TRAF2 $59,6 \pm 2,3$ nM (Mittelwert \pm SEM; $n=3$; $R^2=0,91$).

Als nächstes wurde die Interaktion zwischen hSK1* und $G\alpha_q$ -Protein untersucht. Um zwischen inaktivem und aktivem $G\alpha_q$ -Protein zu unterscheiden, wurde Aluminiumtetrafluorid (AlF_4^-) verwendet, das die G-Protein α -Untereinheit aktiviert, indem es an den $G\alpha$ -GDP-Komplex bindet und eine Konformationsänderung des $G\alpha$ -GDP- $[AlF_4^-]$ -Komplexes induziert. Die resultierende Konformation ähnelt derjenigen des aktiven $G\alpha$ -GTP-Komplexes (Coleman et al. 1994). Interessanterweise zeigten die Messungen, dass die hSK1* sowohl mit inaktivem $G\alpha_q$ als auch mit $[AlF_4^-]$ -aktiviertem $G\alpha_q$ interagiert (Abb. 17). Dabei gab es einen Unterschied (etwa um den Faktor 2) in den k_D -Werten. So betrug der k_D -Wert für die Interaktion der hSK1* mit inaktivem $G\alpha_q$ $141,3 \pm 1,0$ nM (Mittelwert \pm SEM; $n=5$; $R^2=0,73$) und für die Interaktion mit $[AlF_4^-]$ -aktiviertem $G\alpha_q$ $67,7 \pm 0,9$ nM (Mittelwert \pm SEM; $n=3$; $R^2=0,86$). Der Unterschied war signifikant ($p < 0,001$).

Da bei MST die Signalstärke der Interaktion von dem molekularen Gewichtsverhältnis der beiden interagierenden Moleküle abhängt, wurde in einer weiteren Versuchsserie $G\alpha_q$ mit NT-647 ($G\alpha_q^*$) markiert. In den folgenden Experimenten wurde dabei die Menge an $G\alpha_q^*$ konstant gehalten und Verdünnungsreihen von TANK, TRAF2 und hSK1 hergestellt. Nach der Markierung wurde die Konzentration an $G\alpha_q^*$ in der Kapillare bei einer Ausbeute von 100 % mit 523 nM errechnet. Auch hier liegt die reale Ausbeute vermutlich etwas niedriger. Wie erwartet, wurde durch Markierung des kleineren Interaktionspartners ein deutlich stärkeres Thermophoresesignal erhalten. $G\alpha_q^*$ interagiert sowohl in der inaktiven als auch in der $[AlF_4^-]$ -aktivierten Form mit hSK1. Der k_D -Wert betrug für die Interaktion mit der SK1 in inaktivem Puffer $152,0 \pm 5,8$ nM und in $[AlF_4^-]$ -aktiviertem Puffer $144,4 \pm 6,3$ nM. Die Korrelation R^2 der angepassten Kurve betrug in beiden Fällen 0,98. Die Messungen mit markiertem $G\alpha_q$ ergaben also im Gegensatz zu den Messungen mit markierter hSK1 keinen

Unterschied in den k_D -Werten in An- und Abwesenheit von $[AlF_4]^-$. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass $G\alpha_q^*$ nicht mit TANK oder TRAF2 interagiert.

Zusammengefasst zeigen diese Daten zum ersten Mal, dass es eine direkte Interaktion zwischen der SK1 und $G\alpha_q$ gibt und dass diese Interaktion dazu führt, dass die Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und dem anerkannten Effektor PLC β inhibiert wird.

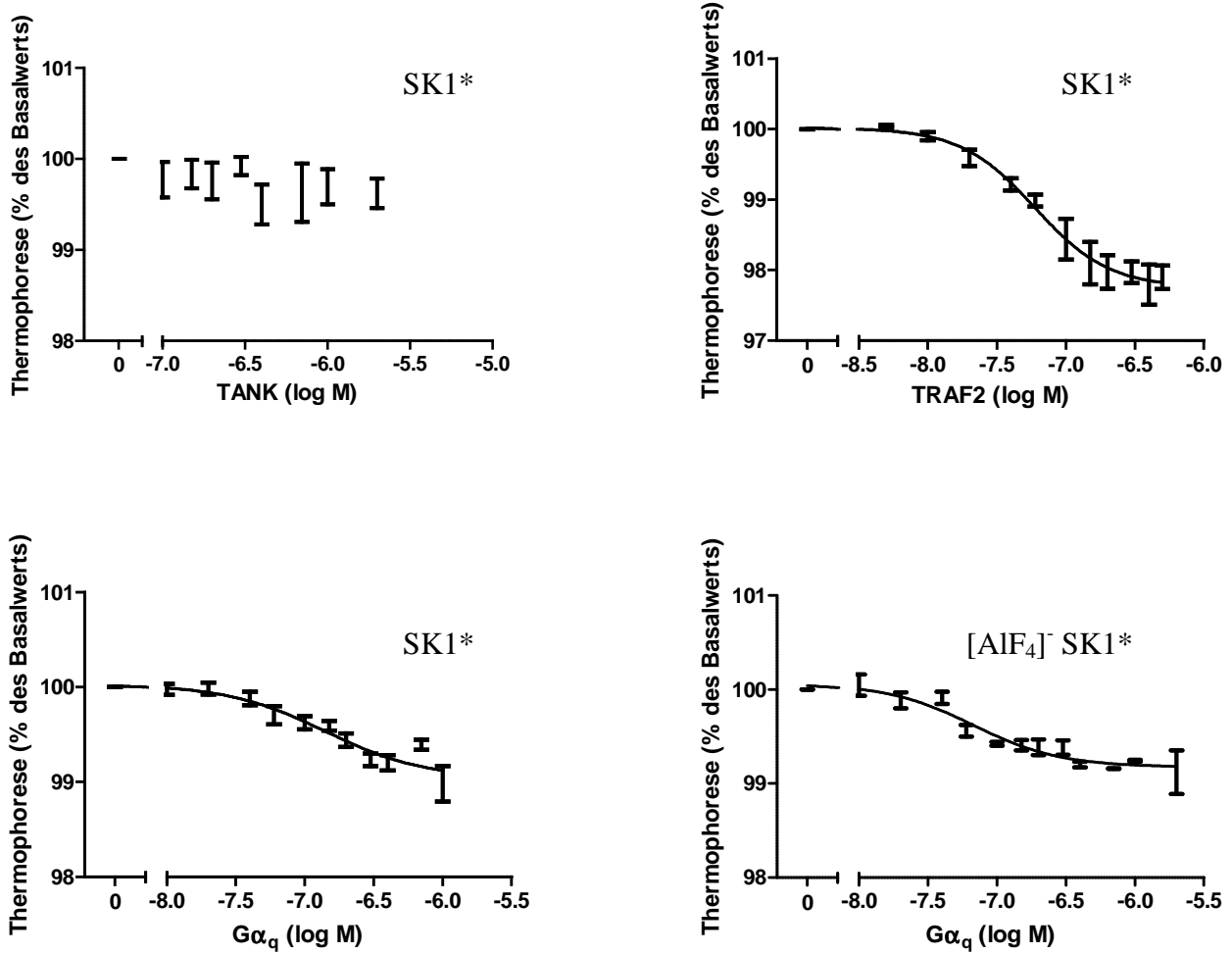


Abb. 17. Interaktion der SK1 mit TANK, TRAF2 und $G\alpha_q$. Gezeigt ist die Thermophorese zwischen dem Fluoreszenz-markierten His6-MBP-hSK1-Protein (SK1*) und einem N-terminalen Fragment des humanen TANK-Proteins (Aminosäuren 1-119), TRAF2 (Aminosäuren 1-502), $G\alpha_q$ (Aminosäuren 7-359) und $[AlF_4]^-$ -aktiviertem $G\alpha_q$. (Mittelwerte \pm SEM; $n \geq 3$ Experimente)

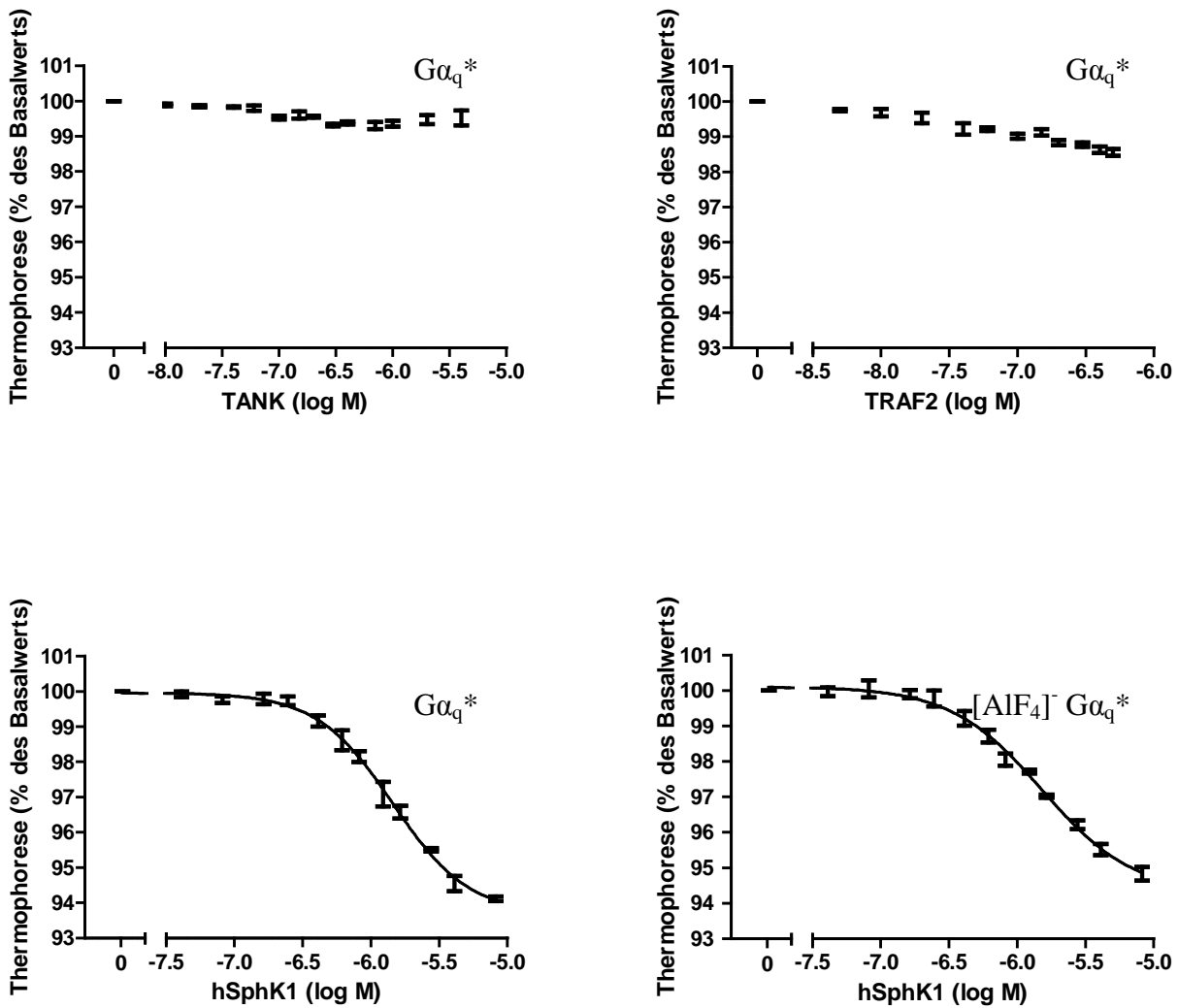


Abb. 18. Interaktion von $G\alpha_q$ mit TANK, TRAF2 und der SK1. Gezeigt ist die Thermophoresis zwischen dem markierten $G\alpha_q$ -Protein ($G\alpha_q^*$) und humanem TANK-Fragment (Aminosäuren 1-119), TRAF2 (Aminosäuren 1-502), sowie His6-MBP-hSK1-Protein in Gegenwart und Abwesenheit von $[AlF_4]^-$. (Mittelwerte \pm SEM; n=3 Experimente)

4. Diskussion

Sphingolipide sind ubiquitäre Bestandteile von Plasmamembranen. Unter allen Sphingolipiden steht S1P aktuell im Fokus des Forschungsinteresses, weil es fundamentale, zelluläre Prozesse wie Migration, Proliferation, Adhäsion und Apoptose reguliert (Spiegel und Milstien 2003). Eine Dysregulation des S1P-Metabolismus wird mit einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter Krebs, Arteriosklerose und Asthma (Pyne und Pyne 2010; Takabe et al. 2008).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit verschiedenen Teilaspekten des S1P-Stoffwechsels. So wurde im ersten Teil der Arbeit mit Hilfe des proteinbasierten Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffs Cameleon untersucht, welche Störungen der S1P-Lyase-Knockout in der Ca^{2+} -Homoöstate verursacht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die autokrine Sekretion von cis-4-Methyl-S1P nach intrazellulärer Phosphorylierung des Prodrugs cis-4-Methylsphingosin nachgewiesen. Im dritten Teil der Arbeit wurde die Interaktion zwischen der SK1 und der G-Proteinuntereinheit $\text{G}\alpha_q$ nachgewiesen. Diese Interaktion ist für das genauere Verständnis der Regulation der S1P-Bildung sowie für das Verständnis der Signalwege von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren von großem Interesse.

4.1. Charakterisierung von S1P-Lyase-defizienten MEFs

Der Knockout der S1P-Lyase führt zu einer Dysregulation des Sphingolipidgleichgewichts und in der Folge zu einer Akkumulation von Sphingosin und S1P in verschiedenen Organen (Bektas et al. 2010; Vogel et al. 2009; Weber et al. 2009). In einem ersten Schritt wurde deshalb mittels LC-MS/MS in Kooperation mit dem Institut für Klinische Pharmakologie überprüft, ob auch in den MEFs in Zellkultur der Gehalt an S1P und Sphingosin in S1P Lyase-defizienten Zellen gegenüber Wildtyp-Zellen verändert ist. Die Messung ergab, dass in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs die intrazelluläre Konzentration an S1P gegenüber *Sgpl1*^{+/+}-MEFs um den Faktor 6 erhöht war. Die Behandlung mit dem Sphingosinkinaseinhibitor SKI-II reduzierte die erhöhten S1P-Spiegel um zwei Drittel. Gleichzeitig akkumulierte in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs intrazellulär doppelt soviel Sphingosin wie in den *Sgpl1*^{+/+}-MEFs. Der erhöhte Gehalt an Sphingosin wurde durch Behandlung mit SKI-II annähernd normalisiert. Folglich kann die Inhibierung der Sphingosinkinaseaktivität zumindest teilweise der S1P-Lyase-Defizienz entgegenwirken.

Die hier mittels LC-MS/MS in MEFs gemessenen Konzentrationen an S1P und Sphingosin unterscheiden sich von den Werten, die von Colié et al. mittels HPLC an den gleichen Zellen gemessen worden sind. So fanden Colié et al. 5 pmol/mg S1P in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs (hier wurden umgerechnet ~0,16 pmol/mg gemessen) und 28 pmol/mg S1P in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs (hier: ~0,8 pmol/mg). Die von Colié et al. gemessenen Sphingosin-Konzentrationen betragen 17 pmol/mg in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs (hier wurden umgerechnet ~8 pmol/mg gemessen) und ~40 pmol/mg in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs (hier: ~15 pmol/mg) (Colié et al. 2009, *Supplemental Data*). Während die hier und von Colié et al. gemessenen Sphingosin-Konzentrationen sich also lediglich um den Faktor 2 unterscheiden, wurden hier etwa um den Faktor 30 niedrigere Konzentrationen an S1P gemessen als von Colié et al. Da diese Ergebnisse an prinzipiell den gleichen Zellen gemessen worden waren (von Dr. Paul P. van Veldhoven, Leuven, Belgien, hergestellte MEFs), beruht der Unterschied der Messwerte am ehesten auf den unterschiedlichen Messmethoden: während hier die Lipidextraktion mittels Methanol/Chloroform-Extraktion erfolgte, die Lipidkonzentrationen durch LC-MS/MS bestimmt wurden und auf parallel extrahierte C17-Standards bezogen wurden, wurden die Lipide von Colié et al. mit 6-Aminochinolin-N-Hydroxysuccinimidylcarbammat derivatisiert, über Festphasenextraktion gewonnen, durch selektive Hydrolyse von interferierenden Lipiden getrennt und anschließend durch HPLC quantifiziert (Colié et al. 2009, *Supplemental Data*). Auffällig ist der von Colié et al. gefundene geringe Unterschied zwischen S1P und Sphingosin, der lediglich Faktor 3 (in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs) bzw. 2 (in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs) beträgt. Meist übersteigen die Sphingosin-Konzentrationen diejenigen von S1P ganz erheblich, von Hannun und Obeid etwa wird in einer Übersichtsarbeit ein Faktor 100 erwähnt (Hannun und Obeid 2008). Folglich liegen die hier gemessenen Werte mit einem Unterschied von Faktor 50 zwischen Sphingosin und S1P in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs eher in diesem Bereich. Interessanterweise lässt sich die Akkumulation der Lipide in Wildtyp- und Knockout-MEFs vergleichen: von Colié et al. wurden eine etwa 6-fache Akkumulation von S1P und eine etwa 2-fache Akkumulation von Sphingosin festgestellt, was mit den hier gemessenen Werten völlig übereinstimmt. Im Vergleich hierzu konnten Hagen et al. zeigen, dass in Kleinhirnneuronen von S1P Lyase-defizienten Mäusen die Konzentration an S1P um den Faktor 20 und die Konzentration an Sphingosin um den Faktor 10 gegenüber derjenigen des Wildtyp erhöht war (Hagen et al. 2009). Diesen Anstiegen der Lipide in kultivierten Zellen steht ein Anstieg von S1P im Thymus der S1P-Lyase-defizienten Mäuse von einem Faktor 1000 gegenüber (Weber et al. 2009). Dagegen waren die Serum-Konzentrationen von S1P in den Knockout-Mäusen lediglich um etwa den Faktor 4 erhöht (Bektas et al. 2010). Diese

Anstiege korrelieren in etwa mit der Expression der S1P-Lyase, die insbesondere im Thymus sehr hoch ist (Bektas et al. 2010).

In Vorarbeiten (ter Braak 2008) waren Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ an mit Fura-2-beladenen MEFs in Suspension durchgeführt worden, die eine erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ und verstärkte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten sowie Thapsigargin in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs gezeigt hatten (Claas et al. 2010). So war in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs die basale $[Ca^{2+}]_i$ um den Faktor 2,5 erhöht. Gleichzeitig reagierten die *Sgpl1*^{-/-}-MEFs auf die Stimulation mit Agonisten wie bspw. Bradykinin, LPA sowie S1P mit deutlich stärkeren $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen. Versuche mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin zeigten, dass im ER von *Sgpl1*^{-/-}-MEFs deutlich mehr Ca^{2+} gespeichert wurde als in Wildtyp-MEFs. Die Blockade der SERCA führt zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, da auch unter basalen Bedingungen permanent Ca^{2+} aus dem ER ins Cytosol austritt, welches anschließend durch die SERCA wieder ins ER zurückgepumpt wird. Der mit Thapsigargin gemessene Anstieg ist folglich proportional zur Menge an Ca^{2+} , die im ER gespeichert wird.

$[Ca^{2+}]_i$ -Messungen an Zellen in Suspension können jedoch leicht durch Artefakte beeinflusst werden. So sind in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs verschiedene Transporter hochreguliert, bspw. die Transporter ABCB1 und ABCC1 (Ihlefeld; persönliche Kommunikation). Diese Hochregulation führt dazu, dass innerhalb bestimmter Organellen Farbstoffe akkumulieren können, die häufig zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ auf Einzelzellebene verwendet werden, so bspw. Rhod-3 oder Fluo-4. Das dem Fluo-4 sehr ähnliche Fluo-3 ist bspw. ein Substrat von ABCC1 (Keppler et al. 1999; Keppler 2011). Eine Akkumulation der Ca^{2+} -Indikatoren in Zellorganellen mit hoher $[Ca^{2+}]_i$ kann jedoch dazu führen, dass die Farbstoffe mit Ca^{2+} gesättigt werden und dies eine Erhöhung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ vortäuscht. Daher wurde in dieser Arbeit die $[Ca^{2+}]_i$ an Einzelzellen mit dem proteinbasierten Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Cameleon gemessen. Dieser Farbstoff ist bereits für eine Vielzahl an Messungen verwendet worden, bspw. für $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen in den afferenten Neuronen von *Caenorhabditis elegans* (Faumont and Lockery 2006), in Wurzelhaaren von *Arabidopsis thaliana* (Monshausen et al. 2008) und im *Nucleus suprachiasmaticus* von Ratten (Hong et al. 2010). Cameleon zeigt eine annähernd homogene Verteilung im Cytosol, ohne innerhalb intrazellulärer Kompartimente zu akkumulieren. Daher verwendeten wir Cameleon, um auszuschließen, dass die erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs ein Messartefakt ist, der bei Messungen in Zellsuspension mit dem Farbstoff Fura-2 auftritt.

Die mit Cameleon generierten Daten zeigen, dass sowohl in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs als auch in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs zwei verschiedene Zellsubtypen existieren, die jeweils durch einen schnellen

und kurzen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bzw. einen langsamen und lang anhaltenden $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg gekennzeichnet sind. Das quantitative Verhältnis dieser Zellsubtypen war in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs und *Sgpl1*^{-/-}-MEFs vergleichbar. Diese Heterogenität der MEF-Zellpopulationen ist verständlich, wenn man bedenkt, dass die MEFs zum Zeitpunkt der Zellgewinnung aus dem Mausembryo bereits teilweise ausdifferenziert sein können und sich deswegen unterscheiden. Der S1P-Lyase-Knockout führt im Subtyp der *Sgpl1*^{-/-}-MEFs mit einem schnellen und kurzen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu einer signifikanten Erhöhung des basalen $[Ca^{2+}]_i$, während im Subtyp mit einem langsamen und langen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg die basale $[Ca^{2+}]_i$ nur leicht, aber nicht signifikant erhöht war. Das Maximum der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit Thapsigargin war dagegen im Subtyp der *Sgpl1*^{-/-}-MEFs mit einem langsamen und langen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg signifikant erhöht, jedoch nicht im Subtyp der *Sgpl1*^{-/-}-MEFs mit einem schnellen und kurzen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Die Speicherung von Ca^{2+} in den Thapsigargin-sensitiven Speichern wird allerdings eher durch die Fläche unterhalb des Zeitverlaufs (AUC) als durch das Maximum des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs wiedergegeben. Die AUC nach der Stimulation mit Thapsigargin war in beiden Subtypen der *Sgpl1*^{-/-}-MEFs signifikant erhöht, was bedeutet, dass in beiden Zellsubtypen vermehrt Ca^{2+} in Thapsigargin-sensitiven Speichern enthalten war. Die mit Cameleon erhaltenen Daten unterstützen daher die mit Fura-2 in Zellsuspension erhaltenen Daten. Gleichzeitig ist der mit Cameleon gemessene Unterschied in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ zwischen *Sgpl1*^{+/+} und *Sgpl1*^{-/-} kleiner als der mit Fura-2 gemessene, vermutlich weil Cameleon trotz eines vergleichbaren K_D -Wertes einen kleineren dynamischen Messbereich aufweist.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs vermehrt Ca^{2+} gespeichert wird sowie die basale cytosolische $[Ca^{2+}]_i$ erhöht ist. Der Grund für die veränderte Calciumhomöostase ist allerdings unbekannt. So lässt sich spekulieren, dass eine erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ in der Folge zu einer vermehrten Speicherung von Ca^{2+} im ER führt. Genauso kann aber auch die erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ die Folge einer vermehrten Ca^{2+} -Speicherung im ER und einer vermehrten Ca^{2+} -Freisetzung sein. Die Beobachtung der veränderten Calciumhomöostase legt den Schluss nahe, dass der S1P-Gehalt eine wichtige Rolle in der Langzeitregulation des intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} spielt (Claas et al. 2010). Bisher ist lediglich beschrieben worden, dass die akute Freisetzung von S1P zu Ca^{2+} -Anstiegen führt (Meyer zu Heringdorf et al. 2003). Als Konsequenz daraus lässt sich darüber spekulieren, dass es intrazellulär direkte Angriffspunkte für S1P geben muss, die bei der Speicherung und/oder der Freisetzung von Ca^{2+} aus Thapsigargin-sensitiven Speichern eine Rolle spielen. So könnte S1P direkt an das ER durchspannende *leak channels*, den IP₃-Rezeptor oder Ca^{2+} -

Kanäle binden oder die Aktivität der SERCA beeinflussen. Welchen Angriffspunkt intrazelluläres S1P am ER hat, werden weitergehende Studien zeigen müssen.

4.2. Nachweis der autokrinen Sekretion von cis-4-Methylsphingosin-1-Phosphat

Cis-4-Methylsphingosin ist ein synthetisches Sphingosinanalogon, das sich von natürlichem D-erythro-Sphingosin durch eine zusätzliche Methylgruppe und die cis-Konfiguration unterscheidet und dadurch nach Phosphorylierung vor dem Abbau durch die S1P-Lyase geschützt ist (van Echten-Deckert et al. 1997).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass cis-4-Methylsphingosin nach der intrazellulären Phosphorylierung sezerniert wird. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass cis-4-Methyl-S1P als Ligand an S1P-Rezeptoren fungieren kann. So wurden mittels LC-MS/MS die Konzentrationen von cis-4-Methylsphingosin und von cis-4-Methyl-S1P in HEK-293-Zellen und in Zellkulturüberständen von HEK-293-Zellen gemessen. Da weder cis-4-Methylsphingosin noch cis-4-Methyl-S1P kommerziell erhältlich waren, wurde der Gehalt an diesen Lipiden in den Proben auf den Gehalt an C17-Sphingosin und C17-S1P normalisiert. Desweiteren wurde 1 mM Orthovanadat ins Medium gegeben, um die Dephosphorylierung von cis-4-Methyl-S1P durch unspezifische Ektophosphatasen zu inhibieren (Gordon 1991). Während der Gehalt an zellulärem Sphingosin durch die Zugabe von Orthovanadat nicht verändert wurde, wurde der Gehalt an zellulärem S1P um den Faktor 7 erhöht (ter Braak et al. 2011).

Die Inkubation mit 1 μ M cis-4-Methylsphingosin führte zu einer intrazellulären Anreicherung dieses Sphingosinanalogs. Daneben ließ sich auch cis-4-Methyl-S1P intrazellulär nachweisen. Auch in den Überständen der behandelten Zellen wurden cis-4-Methylsphingosin und das dazugehörige Phosphat nachgewiesen. Die Konzentration von cis-4-Methyl-S1P im Überstand lag dabei in der gleichen Größenordnung wie diejenige von FTY720-Phosphat, die im Überstand von HEK-293-Zellen nach Inkubation mit FTY720 detektierbar war. In den Experimenten mit FTY720 wurde auf die Zugabe von Orthovanadat verzichtet, da FTY720-Phosphat relativ phosphatasestabil ist und nur durch die Lipidphosphatase LPP3 dephosphoryliert wird (Mechtcheriakova et al. 2007).

Die Inkubation mit cis-4-Methylsphingosin führte außerdem zu einem verminderten zellulären Gehalt an Sphingosin und S1P. Dieser Effekt trat jedoch nur nach der Behandlung mit 10 μ M cis-4-Methylsphingosin, nicht jedoch nach der Behandlung mit 1 μ M cis-4-Methylsphingosin auf und könnte auf der bereits beschriebenen Hemmung der SPT und damit

der Sphingolipidneusynthese durch hohe Konzentrationen dieses Lipids beruhen (van Echten-Deckert et al. 1998). Da die Hemmung der SPT mit der zellulären Konzentration an cis-4-Methylsphingosin-1-Phosphat und nicht mit der Konzentration an cis-4-Methylsphingosin korrelierte, ist es wahrscheinlich, dass dieser Effekt durch das Phosphatderivat vermittelt wird (Sandhoff et al. 1998).

Es wurde bereits gezeigt, dass cis-4-Methyl-S1P in Fibroblasten ähnlich proliferative Eigenschaften wie S1P aufweist, während es in der Neuroblastomzelllinie B104 Apoptose induziert (van Echten-Deckert et al. 1998; Natzker et al. 2002). Weitergehende Untersuchungen an S1P-Lyase-defizienten Neuronen legen nahe, dass die proliferative Wirkung von cis-4-Methylsphingosin auf der Phosphorylierung durch die SK1 beruht, während die proapoptotische Wirkung von cis-4-Methylsphingosin auf der Phosphorylierung durch die SK2 beruht (Hagen et al. 2009). Da die SK1 vornehmlich im Cytosol und nach Aktivierung an der Plasmamembran lokalisiert ist und die SK2 am ER lokalisiert ist, führen vermutlich lokal erhöhte Konzentration an cis-4-Methyl-S1P zu den gegensätzlichen Effekten.

Neben diesen intrazellulären Effekten vermittelt cis-4-Methylsphingosin auch Effekte über GPCRs. So konnte in Vorarbeiten (ter Braak 2008) gezeigt werden, dass cis-4-Methylsphingosin zu einer Internalisierung von S1P-Rezeptoren führte, und zwar insbesondere des S1P₂-Rezeptors und des S1P₃-Rezeptors (ter Braak et al. 2011). Der S1P₁-Rezeptor, der die immunsupprimierende Wirkung von FTY720 vermittelt, wurde dagegen durch cis-4-Methylsphingosin nicht signifikant internalisiert (ter Braak et al. 2011). Zusätzlich wurden S1P-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege, die durch den S1P₂-Rezeptor und den S1P₃-Rezeptor vermittelt werden, inhibiert (ter Braak et al. 2011).

Bisher ist noch nicht geklärt worden, ob cis-4-Methylsphingosin ähnlich wie FTY720 eine immunmodulierende Wirkung besitzt. Gegen diese Annahme spricht die nicht signifikante Internalisierung des S1P₁-Rezeptors durch cis-4-Methylsphingosin. Andererseits könnte auch ein schwacher Agonist am S1P₁-Rezeptor bereits eine Lymphopenie verursachen. Der Effekt von cis-4-Methylsphingosin auf das Immunsystem lässt sich folglich nur durch tierexperimentelle Studien quantifizieren.

Aktuell befinden sich bereits verschiedene spezifische S1P₁-Rezeptor-Agonisten in der Entwicklung, darunter CS-0777, dessen Struktur Ähnlichkeiten mit FTY720 aufweist (Yonesu et al. 2011). Eine weitere Substanz, nämlich ACT-128800, befindet sich bereits in einer Phase II-Studie mit den Indikationszielen Multiple Sklerose und Psoriasis (Piali et al. 2011). GSK2018682, wie ACT-128800 ein spezifischer S1P₁-Rezeptor-Agonist, befindet sich

in einer Phase I-Studie. iSONEP, ein monoklonaler Antikörper, der gegen S1P gerichtet ist, befindet sich mit dem Indikationsziel Altersbedingte Makuladegeneration ebenfalls in einer Phase I-Studie (clinicaltrials.gov).

Da cis-4-Methyl-S1P zu einer starken Internalisierung des S1P_{2/3}-Rezeptors führt, könnte es auch als Leitstruktur für die Entwicklung neuer S1P_{2/3}-Rezeptoragonisten dienen. Diese könnten zur Behandlung von Bluthochdruck und pulmonaler Hypertonie verwendet werden (Skoura und Hla 2009b).

In folgenden Tierexperimenten sollte insbesondere überprüft werden, ob die Applikation von cis-4-Methylsphingosin zu einer Störung des Innenohres mit der Folge von Taubheit oder Gleichgewichtsstörungen führt, da dieser Rezeptor eine wichtige Rolle in der Innenohrvaskularisierung spielt (Kono et al. 2007). Weitere Untersuchungen könnten in der Zukunft die Bindungsaffinität von cis-4-Methyl-S1P an die verschiedenen S1P-Rezeptorsubtypen sowie die jeweils aktivierten Signalwege aufzeigen. Dies erfordert jedoch die Synthese von cis-4-Methylsphingosin und cis-4-Methyl-S1P.

4.3. Charakterisierung und funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen Sphingosinkinase-1 und G α_q

Die SK1 wird durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli aktiviert, so bspw. durch GPCRs, durch Rezeptortyrosinkinasen und durch Zytokinrezeptoren für TNF- α , TGF- β oder Interferon- γ (Alemany et al. 2007). Die Aktivierung der SK1 geht teilweise mit einer Translokation vom Cytosol an die Plasmamembran und mit einer Phosphorylierung an Serin 225 einher (Lidington et al. 2009). Vorarbeiten hatten gezeigt, dass die SK1 nach Stimulation G_q-gekoppelter Rezeptoren wie dem M₃-Rezeptor und dem B₂-Rezeptor an die Plasmamembran transloziert, nicht jedoch nach Stimulation G_i-gekoppelter Rezeptoren wie dem M₂-Rezeptor und dem S1P₁-Rezeptor (ter Braak et al. 2009). Außerdem war gezeigt worden, dass die SK1 permanent an der Plasmamembran von Zellen lokalisiert ist, die konstitutiv aktive Formen von G α_q oder von dem mit G α_q sehr nah verwandten G α_{11} (Sequenzhomologie: 90 %; Hubbard und Hepler 2006) überexprimieren (ter Braak et al. 2009). Die SK1-Lokalisation war hingegen in Zellen, die konstitutiv aktive Formen von G α_i , G α_{12} oder G α_{13} überexprimieren, nicht verändert (ter Braak et al. 2009). Durch weitere Experimente konnte ausgeschlossen werden, dass G_q-abhängige Signalwege wie bspw. eine Erhöhung der [Ca²⁺]_i, die Bildung von Diacylglycerol, die Aktivierung klassischer PKCs, die Aktivierung Ca²⁺/Calmodulin-abhängiger Signalwege oder die Aktivierung der Phospholipase

Die SK1-Translokation nach Stimulation G_q -gekoppelter Rezeptoren auslösen (ter Braak et al. 2009). Desweiteren wird die SK1-Translokation nicht durch Phosphorylierung an Serin 225 ausgelöst, da auch eine SK1-Mutante mit defekter Phosphorylierungsstelle (SK1 S225A) nach Stimulation an die Plasmamembran translozieren konnte (ter Braak et al. 2009). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob $G\alpha_q$ eventuell direkt mit der SK1 interagieren könnte.

Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene Proteine entdeckt, die direkt durch $G\alpha_q$ aktiviert werden können, bspw. RGS-Proteine und GRKs (Abramow-Newerly et al. 2006; Magalhaes et al. 2011), sowie p63RhoGEF (Lutz et al. 2007). Innerhalb der GRK-Familie können nur GRK2 und GRK3 spezifisch mit $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ interagieren, nicht jedoch mit $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_0$ oder $G\alpha_{12/13}$ (Ribas et al. 2007).

Die Serin/Threoninkinase GRK2 beendet die Aktivierung von G_q -gekoppelten Rezeptoren durch zweierlei Mechanismen. Zum einen ist die GRK2 in der Lage, mit ihrer RH-Domäne (*regulator of G protein signalling homology domain*; RGS-homologe Domäne) an aktivierte $G\alpha_q$ -Reste zu binden, die normalerweise ihrerseits den klassischen Effektor PLC β aktivieren, um die G_q -PLC β -Interaktion zu inhibieren (Tesmer et al. 2005). Zum anderen führt die GRK2-Rekrutierung an die Plasmamembran zu einer Phosphorylierung des GPCR, mit der Folge, dass β -Arrestin binden kann und der Rezeptor internalisiert wird. Somit schaltet GRK2 den aktivierten Signalweg ab (Penela et al. 2010).

Durch die Überexpression einer katalytisch inaktiven GRK2-Mutante (GRK2kd) als $G\alpha_q$ -scavenger wurde die Carbachol-induzierte SK1-Translokation in den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen vollständig inhibiert. Diese Inhibition kann aufgrund der Mutation der GRK2 nicht durch Phosphorylierung und Inaktivierung des Rezeptors erklärt werden. Somit beruht die Hemmung der SK1-Translokation am ehesten auf einer Bindung der GRK2 an $G\alpha_q$ mit der Konsequenz, dass die Kopplung an die PLC β oder andere $G\alpha_q$ -Effektoren und nachfolgende Signalkomponenten gehemmt wird. Da allerdings bekannt ist, dass die GRK2 C-terminal eine PH-Domäne (*pleckstrin homology*-Domäne) besitzt, mit der sie an das Membranphospholipid PIP $_2$ und die G-Proteinuntereinheit $G\beta\gamma$ binden kann (Penela et al. 2003), ist es auch möglich, dass die GRK2kd die SK1 von PIP $_2$ -Bindungsstellen an der Plasmamembran verdrängen kann. Bekannt ist auch, dass die SK1 an die Membranlipide Phosphatidylserin (Stahelin et al. 2005) und Phosphatidsäure (Delon et al. 2004) binden kann. Dagegen war in COS-Zellen überexprimierte SK1 nicht in der Lage, an die PIP $_2$ -Moleküle PI(3,4)P $_2$, PI(3,5)P $_2$ oder PI(4,5)P $_2$ sowie PI(3,4,5)P $_3$ zu binden, lediglich eine schwache Bindung an Phosphatidylinositol-3-Monophosphat (PI(3)P) wurde gefunden

(Delon et al. 2004). Hier wurde eine mögliche Rolle von PIP₂ bei der Translokation der SK1 durch verschiedene Inhibitoren sowie exogene Addition von PIP₂ untersucht. Weder eine Langzeitinkubation mit Lithium noch der Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein (Rümenapp et al. 1998) hatten einen signifikanten Effekt auf die Carbachol-vermittelte Translokationshalbwertszeit der YFP-mSK1 in den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen. Allerdings wurde hier nicht näher untersucht, ob die Langzeitinkubation mit Lithium tatsächlich zur Depletion des zellulären PIP₂-Spiegels in HEK-293-Zellen führte. Dagegen ist die Wirkung von Genistein auf den PIP₂-Spiegel in diesen Zellen gut dokumentiert (Rümenapp et al. 1998). Genistein hemmte in HEK-293-Zellen auch die Phospholipase D (Schmidt et al. 1994). Es war bereits gezeigt worden, dass Genistein die M₃-stimulierte SK1-Translokation nicht verhinderte (ter Braak et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wird jetzt zusätzlich gezeigt, dass Genistein auch keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der SK1-Translokation hatte. Auch der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)-Inhibitor LY29-4002 hatte keinen Einfluss auf die Translokationsgeschwindigkeit der SK1. Schließlich hatte auch eine direkte Zugabe von PIP₂ zusammen mit einer Trägersubstanz, dem Histon-Carrier, keinen signifikanten Einfluss auf die Translokationsgeschwindigkeit der SK1. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die durch den M₃-Rezeptor stimulierte SK1-Translokation nicht durch Modulation des PIP₂-Spiegels beeinflusst wird, und dass die Hemmwirkung der GRK2kd nicht auf einer Kompetition um PIP₂ beruht. Dennoch schließen die Ergebnisse nicht aus, dass die SK1 nach erfolgter Translokation an Membranlipide, bspw. Phosphatidylserin, bindet und auf diese Weise permanent an der Membran lokalisiert ist. Zusammengefasst lässt sich aus der Hemmwirkung der GRK2kd schließen, dass die M₃-induzierte SK1-Translokation von G α_q abhängig ist und entweder direkt durch G α_q oder durch G α_q -Effektoren wie die PLC β , deren Aktivierung durch GRK2 gehemmt wird, vermittelt wird.

Um zu überprüfen, ob die SK1 direkt durch G α_q angesteuert wird, oder ob die SK1-Aktivierung sekundär zur PLC β -Aktivierung erfolgt, wurde der Einfluss der SK1-Überexpression auf die PLC β -Aktivierung durch den M₃-Rezeptor untersucht. Dazu wurden HEK-293-Zellen mit GFP-hSK1 oder GFP-Leervektor transfiziert und über Nacht mit ³H-Inositol markiert. Der Gehalt an ³H-markierten Inositolphosphaten wurde durch Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt. Tatsächlich war die Carbachol-induzierte Inositolphosphat-Bildung in GFP-hSK1-überexprimierenden Zellen signifikant reduziert. Um auszuschließen, dass dieser Unterschied auf der katalytischen Aktivität der SK1 beruht, wurde zusätzlich der Einfluss der Überexpression einer katalytisch inaktiven SK1-Mutante (SK1-G82D) untersucht. Auch hier war der Unterschied zwischen Leervektor-überexprimierenden

und SK1-G82D-überexprimierenden Zellen nach Stimulation mit Carbachol statistisch signifikant. Folglich führt die Überexpression der SK1 nach Stimulation des G_q -gekoppelten M_3 -Rezeptors durch Carbachol unabhängig von der katalytischen Aktivität der SK1 zu einer reduzierten Aktivierung der PLC β . Daher kann man ausschließen, dass durch Aktivierung der SK1 entstandenes SIP diesen Effekt verursacht. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die SK1 als direkter $G\alpha_q$ -Effektor mit der PLC β um $G\alpha_q$ konkurriert.

Um weitere Hinweise auf die strukturellen Voraussetzungen für die SK1-Ansteuerung durch $G\alpha_q$ zu erhalten, wurde die rezeptorinduzierte SK1-Translokation in $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ doppelt defizienten MEFs ($G\alpha_{q/11}^{-/-}$ MEFs) untersucht. In diesem Zelltyp war die SK1 erst nach Co-Expression von $G\alpha_q$ in der Lage, nach Stimulation des Bradykininrezeptors an die Plasmamembran zu translozieren. Um den Bereich von $G\alpha_q$ einzuschränken, der mit der SK1 interagiert, wurde der Einfluss verschiedener $G\alpha_q$ -Mutanten auf die Translokationshalbwertszeit der SK1 untersucht. So führten Mutationen in den Bindungsstellen für die PLC β zu einer signifikant verlängerten Translokationshalbwertszeit der SK1 ($G\alpha_q$ -T257E und $G\alpha_q$ -W263D verglichen mit $G\alpha_q$ -Wildtyp).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die $G\alpha_q$ -Reste T257 und W263 in einer Region liegen, für die gezeigt wurde, dass sie verantwortlich für die Aktivierung der PLC β und die Bindung an die GRK2 ist (Tesmer et al. 2005). Die PLC β -Aktivierung wird unter anderem durch Mutation des $G\alpha_q$ -Restes T257 zu Alanin vollständig unterdrückt, aber auch durch Mutationen anderer, in diesem Assay nicht untersuchter $G\alpha_q$ -Reste, die sich in unmittelbarer räumlicher Nähe befinden (Venkatakrishnan und Exton 1996). Die Mutation des $G\alpha_q$ -Restes Y261 zu Alanin führt jedoch zu einer normalen Aktivierung der PLC β . Ebenfalls wurde bereits gezeigt, dass die Mutation der $G\alpha_q$ -Reste T257, Y261 und W263 zu einer verminderten Aktivierung von p63rhoGEF, eines klassischen Effektors von aktiviertem $G\alpha_q$, führt (Shankaranarayanan et al. 2010). Die Bindung an GRK2 wird unter anderem durch die $G\alpha_q$ -Reste T257, Y261 und W263, aber auch andere, in diesem Assay nicht untersuchte Bindungsstellen vermittelt (Day et al. 2004; Tesmer et al. 2005). So konnten Tesmer et al. zeigen, dass die Mutanten $G\alpha_q$ -T257E, $G\alpha_q$ -Y261F, $G\alpha_q$ -Y261L und $G\alpha_q$ -W263D nicht mehr an GRK2 binden. Folglich binden GRK2 und PLC β an nahe beieinander liegende $G\alpha_q$ -Reste. Für die Aktivierung der PLC β ist der T257-Rest von $G\alpha_q$ entscheidend, für die Rekrutierung der GRK2 zusätzlich der Y261-Rest und der W263-Rest. Gleichzeitig führte die Mutation der $G\alpha_q$ -Reste T257 und W263 zu einer verlängerten Translokationshalbwertszeit der SK1. Folglich bindet die SK1 an die gleichen Aminosäuren von $G\alpha_q$ wie die PLC β und GRK2. Dies führt zu einer Konkurrenz um die gleichen $G\alpha_q$ -Bindungsstellen und erklärt die

Inhibierung der SK1-Translokation durch Überexpression der GRK2-kd und die verringerte PLC β -Aktivierung durch Überexpression der SK1.

Um auszuschließen, dass auch über G $_i$ -gekoppelte Rezeptoren eine SK1-Translokation ausgelöst werden kann, wurden $G\alpha_{q/11}^{-/-}$ -MEFs mit HA-S1P $_1$ -Rezeptor und GFP-hSK1 transfiziert und analysiert. Dabei nutzt man die Tatsache aus, dass der S1P $_1$ -Rezeptor lediglich an G $\alpha_{i/0}$ -Signalwege, nicht jedoch an G $\alpha_{q/11}$ -Signalwege koppelt (Chun et al. 2010). Die Stimulation mit S1P löste in S1P $_1$ -Rezeptor-überexprimierenden Zellen keine SK1-Translokation aus. Erst die Coexpression einer Chimäre aus G α_i und G α_q (G α_{i5q} -G66D), welche dem G α_i -gekoppelten S1P $_1$ -Rezeptor ermöglicht G α_q -Signalwege zu aktivieren, führte zur S1P-vermittelten SK1-Translokation. Dies unterstreicht noch einmal die Bedeutung von G α_q für die Ansteuerung der SK1. Es ist allerdings auch möglich, dass die SK1 nach Aktivierung G $_i$ -gekoppelter Rezeptoren zwar nicht transloziert, aber dennoch aktiviert wird.

Um die Interaktion der SK1 mit G α_q auf Proteinebene nachzuweisen, wurde die humane SK1 in den Vektor pMCSG9 kloniert und über den His-Tag und den Maltose-bindenden Protein-Tag aufgereinigt (His6-MBP-SK1). Das rekombinante Protein war in einem Kinase-Aktivitätsassay mit einem fluoreszierenden Sphingosinderivat, nämlich NBD-Sphingosin, als Substrat katalytisch aktiv. Die Umsetzung von NBD-Sphingosin zu NBD-S1P war sowohl von der eingesetzten Menge der SK1 als auch von der Inkubationszeit abhängig. Zusätzlich wurde untersucht, ob die funktionellen Eigenschaften der SK1 mit bereits publizierten Studien übereinstimmen, da bereits verschiedene Arbeitsgruppen die SK1 als Protein exprimiert und funktionell charakterisiert haben (Liu et al. 2000; Nava et al. 2000; Pitson et al. 2000).

So führte Mg $^{2+}$ konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Zunahme der SK1-Aktivität. 1 mM Mg $^{2+}$ erhöhte wie erwartet die SK1-Aktivität signifikant um ungefähr den Faktor 8. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien von Pitson et al., die durch Zugabe von 10 mM Mg $^{2+}$ eine massive Zunahme (~ Faktor 20) der Aktivität der nativen SK1 in Lysaten sowie einer rekombinanten SK1 induzierten (Pitson et al. 2000).

Nava et al. untersuchten den Einfluss von Triton X-100 auf die SK1-Aktivität und konnten zeigen, dass in SK1-überexprimierenden HEK-293-Zellen bereits durch Zugabe von 0,25 % Triton X-100 die Aktivität um ~ den Faktor 2,5 gesteigert werden kann (Nava et al. 2000). Liu et al. untersuchten u.a. ebenfalls den Einfluss von Triton X-100 auf die SK1-Aktivität in SK1-überexprimierenden HEK Zellen. Sie konnten zeigen, dass bereits Konzentrationen von 0,05 % die Aktivität der SK1 um den Faktor 4 erhöhen, während die gleiche Konzentration zu einer SK2-Inhibierung führt. Unterhalb dieser Konzentration sahen Liu et al. keinen Einfluss auf die SK1-Aktivität, höhere Konzentrationen von Triton X-100 (bis 0,5 %) hatten

gegenüber 0,05 % keinen additiven Effekt. Da die Aktivität der SK2 durch Triton X-100 nicht gesteigert sondern eher gehemmt wird (Liu et al. 2000), eignet sich Triton X-100 in einer Konzentration von 0,05 % - 0,5 % für eine selektive Bestimmung der SK1-Aktivität in Zelllysaten. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen gezeigt, dass die Aktivität von His6-MBP-SK1 nach Zugabe von 0,01 % Triton X-100 signifikant steigt, während 0,05 % Triton X-100 keinen Einfluss auf die Aktivität hat und 0,1 % und 0,5 % Triton X-100 zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität führten. Diese voneinander abweichenden Ergebnisse könnten sich dadurch begründen lassen, dass Liu et al. die SK1 in HEK-293-Zellen überexprimierten und anschließend die Aktivität in Zelllysaten bestimmten und nicht den Effekt von Triton X-100 auf aufgereinigtes SK1-Protein untersuchten. Eigene Untersuchungen konnten zeigen, dass die SK1 nach Triton X-100-Zugabe an die Plasmamembran transloziert (nicht gezeigt). Die erhöhte Aktivität, die Liu et al. nachweisen, könnte folglich ein Resultat der Membranassoziiierung der SK1 sein. Eine andere Möglichkeit wäre es, dass Triton X-100 im Zelllysate viele Proteine solubilisiert und so für die Interaktion mit der SK1 weniger Triton X-100 zur Verfügung steht, als wenn Triton X-100 bei gleicher Konzentration lediglich an die SK1 bindet. Deshalb könnte die Konzentrations-Wirkungskurve von Triton im Assay mit der aufgereinigten SK1 im Vergleich zur Konzentrations-Wirkungskurve von Triton im Zelllysate nach links verschoben sein.

Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedener bivalenter Kationen auf die SK1-Aktivität untersucht. So führten neben Mg^{2+} auch Mn^{2+} und Co^{2+} in einer Konzentration von 1 mM zu einer Steigerung der SK1-Aktivität. Der Effekt von Mn^{2+} war hierbei stärker als von Pitson et al. beschrieben und führte zu einer signifikanten Steigerung der SK1-Aktivität um ungefähr den Faktor 11. Co^{2+} erhöhte die SK1-Aktivität signifikant um ungefähr den Faktor 5. Andere untersuchte bivalente Kationen wie Cu^{2+} und Zn^{2+} führten in der gleichen Konzentration nicht zu einer Steigerung der SK1-Aktivität, sondern wirkten im Gegenteil signifikant hemmend. Fe^{2+} hatte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die SK1-Aktivität. Folglich stimmen die hier gemessenen Daten mit denen von Pitson et al. überein.

Desweiteren untersuchten Pitson et al. (2000) den Effekt verschiedener Phospholipide auf die Aktivität der SK1, da vorhergehende Studien (Banno et al. 1998; Olivera et al. 1996) unterschiedliche Resultate geliefert hatten. Pitson et al. konnten zeigen, dass saure Phospholipide wie bspw. Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäure die Aktivität der rekombinanten, in *E. coli* exprimierten und gereinigten humanen SK1 erhöhen. Im hier verwendeten Assay führten jedoch weder Phosphatidylserin (L- α -PS), noch 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol (sn-DOG), noch Proteinkinase C-Lipidaktivator-Komplex zu einem

signifikanten Anstieg der SK1-Aktivität. Allerdings waren bei Pitson et al. die Phospholipide in Gegenwart von Triton X-100 angeboten worden. Außerdem war die Stimulation gering und betrug etwa Faktor 1,6-2, und die Konzentration der verwendeten Lipide wurde nicht angegeben (Pitson et al. 2000).

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss zweier Inhibitoren auf die katalytische Aktivität der His6-MBP-SK1 untersucht. So ist 2-(p-Hydroxyanilino)-4-(p-Chlorophenyl)thiazol (SKI-II) ein selektiver SK1-Inhibitor. French et al. untersuchten die Inhibition der humanen SK1 in *in-vitro assays* nach Aufreinigung des Proteins aus *E. coli* und konnten für SKI-II einen IC_{50} -Wert von 500 ± 300 nM errechnen (French et al. 2003). Auf zellulärer Ebene führt SKI-II zusätzlich zu einem Abbau der SK1, entweder im Lysosom (Ren et al. 2010) oder im Proteasom (Loveridge et al. 2010). Wir untersuchten daher, wie stark SKI-II die His6-MBP-SK1 inhibiert. Eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ SKI-II führte zu einer schwachen, aber signifikanten Reduktion der SK1-Aktivität um $\sim 25\%$. Der in zellbasierten Systemen evidente, stark inhibitorische Effekt von SKI-II auf die SK1 ist folglich eher auf einen Abbau der SK1 zurückzuführen als auf eine direkte Inhibierung des Enzyms. Als letztes wurde der Effekt von Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon) auf die SK1-Aktivität untersucht. Genistein ist ein natürlich vorkommendes Sojaflavonoid, das eine Vielzahl von biologischen Wirkungen vermittelt. Insbesondere inhibiert Genistein die Tumorpheriferation und -metastasierung, indem es die Aktivierung von Akt- und NF- κ B-Signalwegen verringert (Pavese et al. 2010). Zusätzlich zeigt Genistein in einer Konzentration von $10\text{-}200 \mu\text{M}$ proapoptische Eigenschaften. Um die Frage zu beantworten, ob ein Teil dieser Eigenschaften auf einer Hemmung der SK1-Aktivität beruht, wurde Genistein in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ in diesem Assay eingesetzt. Genistein zeigte allerdings keinen SK1-inhibierenden Effekt.

Der direkte Nachweis der Interaktion der SK1 mit $G\alpha_q$ auf Proteinebene erfolgte mit Microscale Thermophoresis (MST). MST nutzt die Eigenschaft von Molekülen aus, innerhalb eines Temperaturgradienten typischerweise vom Ort höherer Temperatur zum Ort niedriger Temperatur zu wandern (Duhr und Braun 2006) und kann daher u.a. zur Messung von Protein-Protein-Interaktionen und zur Bestimmung der Affinität von Proteinen verwendet werden (Wienken et al. 2010). Dafür wurde His6-MBP-SK1-Fusionsprotein mit dem Fluoreszenzfarbstoff NT647 gelabelt (hSK1*).

Die Interaktion der SK1 mit dem TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 2 (TRAF2) spielt eine wesentliche Rolle im TNF- α -Signalweg, da sie für die folgende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B unverzichtbar ist (Xia et al. 2002). Daher wurde die Interaktion

der SK1 mit TRAF2 als Positivkontrolle verwendet. Das N-terminale Fragment (1-119AA) des Proteins *TRAF family member-associated NF-kappa-B activator* (TANK) wurde als Negativkontrolle verwendet, da eine Interaktion mit der SK1 bisher nicht beschrieben wurde.

Die Ergebnisse der MST-Messung zeigen, dass hSK1* wie erwartet mit TRAF2 interagiert. Der errechnete k_D -Wert liegt im Bereich der eingesetzten Konzentration an hSK1*, weshalb eine equimolare Interaktion zwischen SK1 und TRAF2 wahrscheinlich ist.

Ebenfalls konnte mittels MST die Interaktion zwischen hSK1* und $G\alpha_q$ -Protein gezeigt werden. Sowohl $G\alpha_q$ als auch $[AlF_4]^-$ -aktiviertes $G\alpha_q$ waren in der Lage, an die SK1 zu binden, allerdings war die Interaktion der SK1 mit $[AlF_4]^-$ -aktiviertem $G\alpha_q$ signifikant stärker. Der errechnete k_D -Wert liegt für $[AlF_4]^-$ -aktiviertes $G\alpha_q$ im Bereich der eingesetzten Konzentration an hSK1*, weshalb auch hier eine equimolare Interaktion zwischen SK1 und $G\alpha_q$ wahrscheinlich ist.

Da man durch Markierung des kleineren Interaktionspartners ein deutlich stärkeres Thermophoresesignal erhält, wurde auch $G\alpha_q$ markiert ($G\alpha_q^*$). $G\alpha_q^*$ interagiert sowohl in der inaktiven als auch in der $[AlF_4]^-$ -aktivierten Form mit hSK1, allerdings war hier der Unterschied zwischen der Affinität der inaktiven Form von $G\alpha_q^*$ zur hSK1 und der $[AlF_4]^-$ -aktivierten Form von $G\alpha_q^*$ zur hSK1 nicht signifikant. Erwartungsgemäß interagiert $G\alpha_q^*$ nicht mit TANK oder TRAF2.

Die Tatsache, dass sowohl die inaktive Form als auch die $[AlF_4]^-$ -aktivierte Form von $G\alpha_q$ an die SK1 binden können, mag daran liegen, dass in dieser Art von Assay lediglich zwei aufgereinigte Proteine verwendet werden. Intrazellulär liegt $G\alpha_q$ jedoch gebunden an $G\beta\gamma$ vor. Dieser Proteinkomplex zerfällt nach Aktivierung und $G\alpha_q$ aktiviert seinerseits verschiedene Effektoren, darunter auch die SK1. So könnte es sein, dass die SK1 an $G\alpha_q$ -Reste bindet, die intrazellulär innerhalb der $G\alpha/G\beta\gamma$ -Grenzfläche verborgen sind und erst durch Aktivierung freigelegt werden, im Assay jedoch bereits frei vorliegen.

Der Fokus der Forschung sollte zukünftig darauf ausgerichtet sein, weitere Interaktionspartner der SK1 zu finden. Insbesondere sollten andere Proteine, die aufgrund ihrer bereits gezeigten Interaktion mit $G\alpha_q$ im G_q -Signalweg eine zentrale Rolle spielen, auf eine Interaktion mit der SK1 hin untersucht werden. Möglich ist auch hier eine SK1/S1P-abhängige Regulation bspw. der GAP-Aktivität verschiedener RGS-Proteine. Dies würde darauf hindeuten, dass die SK1 Teil eines größeren G_q -Signallosoms ist.

Klinisch relevant ist die Beobachtung, dass in einer Vielzahl von Tumoren, die von Melanocyten im Auge oder in der Haut ausgehen, eine Mutation von $G\alpha_q$ gefunden wurde ($G\alpha_q$ Q209L), die dazu führt, dass $G\alpha_q$ konstitutiv aktiv ist und permanent MAP-Kinasen

aktiviert (van Raamsdonk et al. 2009). Weiterführende Studien konnten zeigen, dass diese Mutation nur in melanocytären Tumoren wie malignen Naevi (83 %), Uveamelanomen (46 %) oder Melanocytomen des ZNS (50 %) gefunden wird und nicht in Tumoren anderer Gewebe (Kusters-Vandavelde et al. 2009; Lamba et al. 2009). Dieselbe Mutation führt zu einer permanenten Lokalisation der SK1 an der Plasmamembran und damit auch zu einer Erhöhung der SK1-Aktivität (ter Braak et al. 2009). Daher sollte untersucht werden, ob in diesen Tumoren die SK1-Lokalisation und die SK1-Aktivität im Vergleich zum umliegenden Gewebe verändert ist. Zusätzlich sollte im Tierversuch die Frage geklärt werden, ob die Gabe eines SK1-Inhibitors insbesondere in diesem Tumortyp Proliferation und Metastasierung inhibieren kann.

Zusammengefasst wird in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass es eine direkte Interaktion zwischen der SK1 und $G\alpha_q$ gibt. Die SK1 bindet dabei innerhalb desselben Bereichs von $G\alpha_q$, in dem auch andere Effektoren wie die PLC β und die GRK2 binden. Gleichzeitig führt diese Interaktion dazu, dass die Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und der PLC β inhibiert wird. Die SK1 ist folglich ein weiterer Effektor des Signalmoleküls $G\alpha_q$.

5. Zusammenfassung

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Teilaspekte des S1P-Signalsystems näher untersucht. Der erste Teil der Arbeit geht der Frage nach, welche Störungen das Ausschalten der S1P-Lyase in der Ca^{2+} -Homöostase verursacht. Die Messung der zellulären Lipidkonzentrationen ergab in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs einen sechsfach höheren Wert für S1P und einen doppelt so hohen Wert für Sphingosin als in den *Sgpl1*^{+/+}-MEFs. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde an Einzelzellen mit Hilfe des Proteinfarbstoffs Cameleon untersucht, wobei $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin induziert wurden. So konnte gezeigt werden, dass sowohl in *Sgpl1*^{+/+}-MEFs als auch in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs zwei verschiedene Subtypen existieren, die sich hinsichtlich Geschwindigkeit und Ausmaß des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs unterscheiden. Die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war im Subtyp der *Sgpl1*^{-/-}-MEFs mit einem schnellen und kurzen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg signifikant erhöht, während das Maximum des Thapsigargin-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs im Subtyp der *Sgpl1*^{-/-}-MEFs mit einem langsamen und langen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg signifikant erhöht war. Die AUC des Zeitverlaufs nach der Stimulation mit Thapsigargin war in beiden Subtypen der *Sgpl1*^{-/-}-MEFs signifikant erhöht, was bedeutet, dass der Ca^{2+} -Gehalt der Thapsigargin-sensitiven Speicher in *Sgpl1*^{-/-}-MEFs höher als in Wildtyp-MEFs war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Aspekte der Modulation des S1P-Signalsystems durch das Sphingosin-Analogon cis-4-Methylsphingosin näher untersucht. Die Messung der Lipidkonzentrationen von cis-4-Methylsphingosin und dem Phosphorylierungsprodukt cis-4-Methyl-S1P erfolgte dabei in HEK-293-Zellen und deren Überständen mittels LC-MS/MS. Hierbei wurde erstmals cis-4-Methyl-S1P im Zellkulturüberstand nachgewiesen, was bedeutet, dass cis-4-Methylsphingosin nach der intrazellulären Phosphorylierung sezerniert werden kann. Dieser Mechanismus bildet die Grundlage dafür, dass cis-4-Methylsphingosin nicht nur intrazellulär wirken, sondern ebenso wie FTY720 als S1P-Rezeptor-Modulator fungieren kann.

Der dritte und umfangreichste Teil der Arbeit befasst sich mit der Regulation der SK1 durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Um die Rolle von $\text{G}\alpha_{q/11}$ -Proteinen bei der Ansteuerung der SK1 durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weiter zu analysieren, wurde zunächst die Rezeptor-induzierte Translokation der SK1 in MEFs untersucht, die sowohl in $\text{G}\alpha_q$ als auch in seinem Homolog $\text{G}\alpha_{11}$ doppelt defizient waren (*Gα_{q/11}*^{-/-}-MEFs). Die SK1-Translokation war nur nach Transfektion mit $\text{G}\alpha_q$ möglich. Um Hinweise auf die strukturellen Erfordernisse für die SK1-Ansteuerung durch $\text{G}\alpha_q$ zu erhalten, wurde der Einfluss verschiedener $\text{G}\alpha_q$ -Mutanten auf die Translokationshalbwertszeit der SK1 untersucht. So waren alle untersuchten Mutanten

in der Lage, die SK1-Translokation in $G\alpha_{q/11}^{-/-}$ -MEFs zu vermitteln. Die Expression der $G\alpha_q$ -W263D-Mutante führte dabei zu einer signifikant verlangsamten SK1-Translokation. Die durch $G\alpha_q$ -T257E-vermittelte Translokation war erst nach mehreren Minuten feststellbar.

Die Abhängigkeit der SK1-Translokation von $G\alpha_q$ wurde auf zellulärer Ebene durch Coexpression einer katalytisch inaktiven Mutante der G-Protein gekoppelter Rezeptorkinase 2 (GRK2) als $G\alpha_q$ -scavenger in HEK3-Zellen nachgewiesen. Dies führte zu einer vollständigen Inhibierung der Carbachol-induzierten SK1-Translokation. Hingegen führte die Überexpression der SK1 in den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen zu einer reduzierten Carbachol-induzierten Aktivierung der PLC β . Dieser Effekt war unabhängig von der katalytischen Aktivität der SK1. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die SK1 mit den Effektoren GRK2 und PLC β um gemeinsame Bindungsstellen der aktivierten G-Protein Untereinheit $G\alpha_q$ konkurriert. Zusätzlich wurde die direkte Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und SK1 auf Proteinebene mittels optischer Thermophorese nachgewiesen. Dazu wurde die humane SK1 als N-terminal getaggtetes His6-MBP-Fusionsprotein exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass die mit dem Fluoreszenzfarbstoff NT647-markierte hSK1 (hSK1*) mit dem TNF Rezeptor-assoziiertem Faktor 2 (TRAF2), nicht jedoch mit dem N-terminalen Fragment des *TRAF family member-associated NF-kappa-B activator* (TANK) interagiert. Sowohl inaktives $G\alpha_q$ als auch $[AlF_4]^-$ -aktiviertes $G\alpha_q$ interagierten mit der hSK1* mit einem vergleichbaren k_D -Wert. Auch mit NT-647-markiertes $G\alpha_q$ interagiert mit der hSK1 sowohl in der inaktiven als auch in der $[AlF_4]^-$ -aktivierten Form, wohingegen es nicht mit TANK oder TRAF2 interagiert.

Insgesamt zeigen die erhaltenen Daten, dass die SK1 ein direktes Target von $G\alpha_q$ ist und sie an genau dieselben $G\alpha_q$ -Reste bindet, an die auch die klassischen Effektoren PLC β , p63RhoGEF und GRK2 binden.

6. Literaturverzeichnis

Abramow-Newerly, M., A. A. Roy, C. Nunn und P. Chidiac. 2006. "RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins." *Cell Signal.* 18:579-591.

Aittaleb, M., C. A. Boguth und J. J. Tesmer. 2010. "Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors." *Mol.Pharmacol.* 77:111-125.

Aleman, R., C. J. van Koppen, K. Danneberg, M. ter Braak und D. Meyer zu Heringdorf. 2007. "Regulation and functional roles of sphingosine kinases." *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 374:413-428.

Allende, M. L., T. Sasaki, H. Kawai, A. Olivera, Y. Mi, G. van Echten-Deckert, R. Hajdu, M. Rosenbach, C. A. Keohane, S. Mandala, S. Spiegel und R. L. Proia. 2004. "Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720." *J. Biol. Chem.* 279:52487-52492.

Alvarez, S. E., K. B. Harikumar, N. C. Hait, J. Allegood, G. M. Strub, E. Y. Kim, M. Maceyka, H. Jiang, C. Luo, T. Kordula, S. Milstien und S. Spiegel. 2010. "Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2." *Nature.* 465:1084-1088.

Bandhuvula, P., Y. Y. Tam, B. Oskouian und J. D. Saba. 2005. "The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity." *J. Biol. Chem.* 280:33697-33700.

Banno, Y., M. Kato, A. Hara und Y. Nozawa. 1998. "Evidence for the presence of multiple forms of Sph kinase in human platelets." *Biochem. J.* 335 (Pt 2):301-304.

Bektas, M., M. L. Allende, B. G. Lee, W. Chen, M. J. Amar, A. T. Remaley, J. D. Saba und R. L. Proia. 2010. "Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver." *J. Biol. Chem.* 285:10880-10889.

Berridge, M. J., P. Lipp und M. D. Bootman. 2000. "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:11-21.

- Birchwood, C. J., J. D. Saba, R. C. Dickson und K. W. Cunningham. 2001. "Calcium influx and signaling in yeast stimulated by intracellular sphingosine-1-phosphate accumulation." *J. Biol. Chem.* 276:11712-11718.
- Bode, C., S. C. Sensken, U. Peest, G. Beutel, F. Thol, B. Levkau, Z. Li, R. Bittman, T. Huang, M. Tolle, M. van der Giet und M. H. Gräler. 2010. "Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine-1-phosphate." *J. Cell Biochem.* 109:1232-1243.
- Bourquin, F., H. Riezman, G. Capitani und M. G. Grutter. 2010. "Structure and function of sphingosine-1-phosphate lyase, a key enzyme of sphingolipid metabolism." *Structure.* 18:1054-1065.
- Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brinkmann, V. 2009. "FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system." *Br. J. Pharmacol.* 158:1173-1182.
- Brinkmann, V., A. Billich, T. Baumruker, P. Heining, R. Schmouder, G. Francis, S. Aradhye und P. Burtin. 2010. "Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis." *Nat. Rev. Drug Discov.* 9:883-897.
- Bunney, T. D. und M. Katan. 2011. "PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms." *Trends Biochem. Sci.* 36:88-96.
- Caulfield, M. P. und N. J. Birdsall. 1998. "International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors." *Pharmacol. Rev.* 50:279-290.
- Chiu, C. T. und D. M. Chuang. 2010. "Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders." *Pharmacol. Ther.* 128:281-304.

Christoffersen, C., H. Obinata, S. B. Kumaraswamy, S. Galvani, J. Ahnstrom, M. Sevvana, C. Egerer-Sieber, Y. A. Muller, T. Hla, L. B. Nielsen und B. Dahlback. 2011. "Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:9613-9618.

Chudakov, D. M., M. V. Matz, S. Lukyanov und K. A. Lukyanov. 2010. "Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues." *Physiol Rev.* 90:1103-1163.

Chun, J., T. Hla, K. R. Lynch, S. Spiegel und W. H. Moolenaar. 2010. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature." *Pharmacol. Rev.* 62:579-587.

Claas, R. F., M. ter Braak, B. Hegen, V. Hardel, C. Angioni, H. Schmidt, K. H. Jakobs, P. P. van Veldhoven und D. Meyer zu Heringdorf. 2010. "Enhanced Ca²⁺ storage in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts." *Cell Signal.* 22:476-483.

Colie, S., P. P. van Veldhoven, B. Kedjouar, C. Bedia, V. Albinet, S. C. Sorli, V. Garcia, M. Djavaheri-Mergny, C. Bauvy, P. Codogno, T. Levade und N. Andrieu-Abadie. 2009. "Disruption of sphingosine-1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation." *Cancer Res.* 69:9346-9353.

Cuvillier, O., G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, S. Gutkind und S. Spiegel. 1996. "Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate." *Nature.* 381:800-803.

Day, P. W., J. J. Tesmer, R. Sterne-Marr, L. C. Freeman, J. L. Benovic und P. B. Wedegaertner. 2004. "Characterization of the GRK2 binding site of Galphaq." *J. Biol. Chem.* 279:53643-53652.

Delon, C., M. Manifava, E. Wood, D. Thompson, S. Krugmann, S. Pyne und N. T. Ktistakis. 2004. "Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid." *J. Biol. Chem.* 279:44763-44774.

Ding, G., H. Sonoda, H. Yu, T. Kajimoto, S. K. Goparaju, S. Jahangeer, T. Okada und S. Nakamura. 2007. "Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2." *J. Biol. Chem.* 282:27493-27502.

Donnelly, M. I., M. Zhou, C. S. Millard, S. Clancy, L. Stols, W. H. Eschenfeldt, F. R. Collart und A. Joachimiak. 2006. "An expression vector tailored for large-scale, high-throughput purification of recombinant proteins." *Protein Expr. Purif.* 47:446-454.

Duhr, S. und D. Braun. 2006. "Why molecules move along a temperature gradient." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:19678-19682.

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

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

Eckhardt, M. 2010. "Pathology and current treatment of neurodegenerative sphingolipidoses." *Neuromolecular. Med.* 12:362-382.

Evanko, D. S. und P. G. Haydon. 2005. "Elimination of environmental sensitivity in aameleon FRET-based calcium sensor via replacement of the acceptor with Venus." *Cell Calcium.* 37:341-348.

Faumont, S. und S. R. Lockery. 2006. "The awake behaving worm: simultaneous imaging of neuronal activity and behavior in intact animals at millimeter scale." *J. Neurophysiol.* 95:1976-1981.

Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin und H. B. Schioth. 2003. "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralagon groups, and fingerprints." *Mol. Pharmacol.* 63:1256-1272.

French, K. J., R. S. Schrecengost, B. D. Lee, Y. Zhuang, S. N. Smith, J. L. Eberly, J. K. Yun und C. D. Smith. 2003. "Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase." *Cancer Res.* 63:5962-5969.

Fukuda, Y., Y. Aoyama, A. Wada und Y. Igarashi. 2004. "Identification of PECAM-1 association with sphingosine kinase 1 and its regulation by agonist-induced phosphorylation." *Biochim. Biophys. Acta.* 1636:12-21.

Golfier, S., S. Kondo, T. Schulze, T. Takeuchi, G. Vassileva, A. H. Achtman, M. H. Gräler, S. J. Abbondanzo, M. Wiekowski, E. Kremmer, Y. Endo, S. A. Lira, K. B. Bacon und M. Lipp. 2010. "Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P₄." *FASEB J.* 24:4701-4710.

Goparaju, S. K., P. S. Jolly, K. R. Watterson, M. Bektas, S. Alvarez, S. Sarkar, L. Mel, I. Ishii, J. Chun, S. Milstien und S. Spiegel. 2005. "The S1P₂-receptor negatively regulates platelet-derived growth factor-induced motility and proliferation." *Mol. Cell Biol.* 25:4237-4249.

Gordon, J. A. 1991. "Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor." *Method. Enzymol.* 201: 477-482.

Grynkiewicz, G., M. Poenie und R. Y. Tsien. 1985. "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450.

Hagen, N., P. P. van Veldhoven, R. L. Proia, H. Park, A. H. Merrill, Jr. und G. van Echten-Deckert. 2009. "Subcellular origin of sphingosine-1-phosphate is essential for its toxic effect in lyase-deficient neurons." *J. Biol. Chem.* 284:11346-11353.

Hait, N. C., J. Allegood, M. Maceyka, G. M. Strub, K. B. Harikumar, S. K. Singh, C. Luo, R. Marmorstein, T. Kordula, S. Milstien und S. Spiegel. 2009. "Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate." *Science.* 325:1254-1257.

Hait, N. C., C. A. Oskeritzian, S. W. Paugh, S. Milstien und S. Spiegel. 2006. "Sphingosine kinases, sphingosine-1-phosphate, apoptosis and diseases." *Biochim. Biophys. Acta.* 1758:2016-2026.

Hannun, Y. A. und L. M. Obeid. 2008. "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:139-150.

Hayashi, S., T. Okada, N. Igarashi, T. Fujita, S. Jahangeer und S. Nakamura. 2002. "Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein." *J. Biol. Chem.* 277:33319-33324.

Hisano, Y., N. Kobayashi, A. Kawahara, A. Yamaguchi und T. Nishi. 2011. "The sphingosine-1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720." *J. Biol. Chem.* 286:1758-1766.

Hong, J. H., C. H. Min, B. Jeong, T. Kojiya, E. Morioka, T. Nagai, M. Ikeda und K. J. Lee. 2010. "Intracellular calcium spikes in rat suprachiasmatic nucleus neurons induced by BAPTA-based calcium dyes." *PLoS. One.* 5:e9634.

Huang, C. C. und J. J. Tesmer. 2011. "Recognition in the face of diversity: interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor (GPCR) kinases with activated GPCRs." *J. Biol. Chem.* 286:7715-7721.

Hubbard, K. B. und J. R. Hepler. 2006. "Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins." *Cell Signal.* 18:135-150.

Ikeda, M., A. Kihara und Y. Igarashi. 2004. "Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325:338-343.

Ingwersen, J., O. Aktas, P. Kuery, B. Kieseier, A. Boyko und H. P. Hartung. 2011. "Fingolimod in multiple sclerosis: Mechanisms of action and clinical efficacy." *Clin. Immunol.* 142:15-24.

Ishii, I., X. Ye, B. Friedman, S. Kawamura, J. J. Contos, M. A. Kingsbury, A. H. Yang, G. Zhang, J. H. Brown und J. Chun. 2002. "Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3." *J. Biol. Chem.* 277:25152-25159.

Ito, K., Y. Anada, M. Tani, M. Ikeda, T. Sano, A. Kihara und Y. Igarashi. 2007. "Lack of sphingosine-1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357:212-217.

Jarman, K.E., P.A. Moretti, J.R. Zebol, and S.M. Pitson. 2010. "Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1." *J. Biol. Chem.* 285:483-492.

Jason-Moller, L., M. Murphy und J. Bruno. 2006. "Overview of Biacore systems and their applications." *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 19.

Jenne, C. N., A. Enders, R. Rivera, S. R. Watson, A. J. Bankovich, J. P. Pereira, Y. Xu, C. M. Roots, J. N. Beilke, A. Banerjee, S. L. Reiner, S. A. Miller, A. S. Weinmann, C. C. Goodnow, L. L. Lanier, J. G. Cyster und J. Chun. 2009. "T-bet-dependent S1P₅ expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow." *J. Exp. Med.* 206:2469-2481.

Jerabek-Willemsen, M., C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske und S. Duhr. 2011. "Molecular interaction studies using microscale thermophoresis." *Assay. Drug Dev. Technol.* 9:342-353.

Kawahara, A., T. Nishi, Y. Hisano, H. Fukui, A. Yamaguchi und N. Mochizuki. 2009. "The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors." *Science.* 323:524-527.

Keppler, D., Y. Cui, J. König, I. Leier und A. Nies. 1999. "Export pumps for anionic conjugates encoded by MRP genes." *Adv. Enzyme Regul.* 39:237-246.

Keppler, D. 2011. "Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy." *Handb. Exp. Pharmacol.* 201:299-323.

Kono, M., I. A. Belyantseva, A. Skoura, G. I. Frolenkov, M. F. Starost, J. L. Dreier, D. Lidington, S. S. Bolz, T. B. Friedman, T. Hla und R. L. Proia. 2007. "Deafness and stria vascularis defects in S1P₂ receptor-null mice." *J. Biol. Chem.* 282:10690-10696.

Kostenis, E., L. Martini, J. Ellis, M. Waldhoer, A. Heydorn, M. M. Rosenkilde, P. K. Norregaard, R. Jorgensen, J. L. Whistler und G. Milligan. 2005a. "A highly conserved glycine within linker I and the extreme C terminus of G protein alpha subunits interact cooperatively in switching G protein-coupled receptor-to-effector specificity." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313:78-87.

Kostenis, E., M. Waelbroeck und G. Milligan. 2005b. "Techniques: promiscuous Galpha proteins in basic research and drug discovery." *Trends Pharmacol. Sci.* 26:595-602.

Kumar, A., H. S. Byun, R. Bittman und J. D. Saba. 2011. "The sphingolipid degradation product trans-2-hexadecenal induces cytoskeletal reorganization and apoptosis in a JNK-dependent manner." *Cell Signal.* 23:1144-1152.

Kumar, A. und J. D. Saba. 2009. "Lyase to live by: sphingosine phosphate lyase as a therapeutic target." *Expert. Opin. Ther. Targets.* 13:1013-1025.

Kupperman, E., S. An, N. Osborne, S. Waldron und D. Y. Stainier. 2000. "A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development." *Nature.* 406:192-195.

Kusters-Vandeveld, H. V., A. Klaasen, B. Kusters, P. J. Groenen, van Engen-van Grunsven I. A., M. R. van Dijk, G. Reifenberger, P. Wesseling und W. A. Blokk. 2009. "Activating mutations of the GNAQ gene: a frequent event in primary melanocytic neoplasms of the central nervous system." *Acta Neuropathol.* 119:317-323.

Lacana, E., M. Maceyka, S. Milstien und S. Spiegel. 2002. "Cloning and characterization of a protein kinase A anchoring protein (AKAP)-related protein that interacts with and regulates sphingosine kinase 1 activity." *J. Biol. Chem.* 277:32947-32953.

Lamba, S., L. Felicioni, F. Buttitta, F. E. Bleeker, S. Malatesta, V. Corbo, A. Scarpa, M. Rodolfo, M. Knowles, M. Frattini, A. Marchetti und A. Bardelli. 2009. "Mutational profile of GNAQQ209 in human tumors." *PLoS. One.* 4:e6833.

Lidington, D., B. F. Peter, A. Meissner, J. T. Kroetsch, S. M. Pitson, U. Pohl und S. S. Bolz. 2009. "The phosphorylation motif at serine 225 governs the localization and function of sphingosine kinase 1 in resistance arteries." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29:1916-1922.

Liu, H., M. Sugiura, V. E. Nava, L. C. Edsall, K. Kono, S. Poulton, S. Milstien, T. Kohama und S. Spiegel. 2000. "Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform." *J. Biol. Chem.* 275:19513-19520.

Liu, H., R. E. Toman, S. K. Goparaju, M. Maceyka, V. E. Nava, H. Sankala, S. G. Payne, M. Bektas, I. Ishii, J. Chun, S. Milstien und S. Spiegel. 2003. "Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis." *J. Biol. Chem.* 278:40330-40336.

Lloyd-Evans, E., A. J. Morgan, X. He, D. A. Smith, E. Elliot-Smith, D. J. Sillence, G. C. Churchill, E. H. Schuchman, A. Galione und F. M. Platt. 2008. "Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium." *Nat. Med.* 14:1247-1255.

Lloyd-Evans, E., D. Pelled, C. Riebeling, J. Bodennec, A. de Morgan, H. Waller, R. Schiffmann und A. H. Futerman. 2003. "Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms." *J. Biol. Chem.* 278:23594-23599.

Lodowski, D. T., J. F. Barnhill, R. M. Pyskadlo, R. Ghirlando, R. Sterne-Marr und J. J. Tesmer. 2005. "The role of G beta gamma and domain interfaces in the activation of G protein-coupled receptor kinase 2." *Biochemistry.* 44:6958-6970.

Loveridge, C., F. Tonelli, T. Leclercq, K. G. Lim, J. S. Long, E. Berdyshev, R. J. Tate, V. Natarajan, S. M. Pitson, N. J. Pyne und S. Pyne. 2010. "The sphingosine kinase 1 inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl)thiazole induces proteasomal degradation of sphingosine kinase 1 in mammalian cells." *J. Biol. Chem.* 285:38841-38852.

Lutz, S., A. Shankaranarayanan, C. Coco, M. Ridilla, M. R. Nance, C. Vettel, D. Baltus, C. R. Evelyn, R. R. Neubig, T. Wieland und J. J. G. Tesmer. 2007. "Structure of G α_q -p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs." *Science*. 318:1923-1927.

Maceyka, M., S. E. Alvarez, S. Milstien und S. Spiegel. 2008. "Filamin A links sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 1 at lamellipodia to orchestrate cell migration." *Mol. Cell Biol.* 28:5687-5697.

Magalhaes, A. C., H. Dunn und S. S. Ferguson. 2011. "Regulation of G protein-coupled receptor activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins." *Br. J. Pharmacol.* 165:1717-1736.

Mandala, S., R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G. J. Shei, D. Card, C. Keohane, M. Rosenbach, J. Hale, C. L. Lynch, K. Rupprecht, W. Parsons und H. Rosen. 2002. "Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists." *Science*. 296:346-349.

Mechtcheriakova, D., A. Wlachos, J. Sobanov, F. Bornancin, G. Zlabinger, T. Baumruker und A. Billich. 2007. "FTY720-phosphate is dephosphorylated by lipid phosphate phosphatase 3." *FEBS Lett.* 581:3063-3068.

Meyer zu Heringdorf, D., K. Liliom, M. Schaefer, K. Danneberg, J. H. Jaggar, G. Tigyi und K. H. Jakobs. 2003. "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. und K. H. Jakobs. 2007. "Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism." *Biochim. Biophys. Acta.* 1768:923-940.

Milosevic, I., J. B. Sorensen, T. Lang, M. Krauss, G. Nagy, V. Haucke, R. Jahn und E. Neher. 2005. "Plasmalemmal Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells." *J. Neurosci.* 25:2557-2565.

Mitra, P., C. A. Oskeritzian, S. G. Payne, M. A. Beaven, S. Milstien und S. Spiegel. 2006. "Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:16394-16399.

Mizugishi, K., T. Yamashita, A. Olivera, G. F. Miller, S. Spiegel und R. L. Proia. 2005. "Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development." *Mol. Cell Biol.* 25:11113-11121.

Monaco, S., M. Illario, M. R. Rusciano, G. Gragnaniello, G. Di Spigna, E. Leggiero, L. Pastore, G. Fenzi, G. Rossi und M. Vitale. 2009. "Insulin stimulates fibroblast proliferation through calcium-calmodulin-dependent kinase II." *Cell Cycle.* 8:2024-2030.

Monshausen, G. B., M. A. Messerli und S. Gilroy. 2008. "Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca^{2+} follow oscillating increases in growth in root hairs of Arabidopsis." *Plant Physiol.* 147:1690-1698.

Nagai, T., S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa und A. Miyawaki. 2004. "Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:10554-10559.

Nallamsetty, S. und D. S. Waugh. 2007. "A generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in Escherichia coli using a combinatorial His6-maltose binding protein fusion tag." *Nat. Protoc.* 2:383-391.

Natzker, S., T. Heinemann, S. Figueroa-Perez, B. Schnieders, R. R. Schmidt, K. Sandhoff und G. van Echten-Deckert. 2002. "Cis-4-methylsphingosine phosphate induces apoptosis in neuroblastoma cells by opposite effects on p38 and ERK mitogen-activated protein kinases." *Biol. Chem.* 383:1885-1894.

Nava, V. E., E. Lacana, S. Poulton, H. Liu, M. Sugiura, K. Kono, S. Milstien, T. Kohama und S. Spiegel. 2000. "Functional characterization of human sphingosine kinase-1." *FEBS Lett.* 473:81-84.

Neher, E. und T. Sakaba. 2008. "Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release." *Neuron*. 59:861-872.

Offermanns, S., T. Wieland, D. Homann, J. Sandmann, E. Bombien, K. Spicher, G. Schulz und K. H. Jakobs. 1994. "Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to G_i-type G-proteins and G_{q11}." *Mol. Pharmacol.* 45:890-898.

Offermanns, S., L. P. Zhao, A. Gohla, I. Sarosi, M. I. Simon und T. M. Wilkie. 1998. "Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice." *EMBO J.* 17:4304-4312.

Olivera, A., J. Rosenthal und S. Spiegel. 1996. "Effect of acidic phospholipids on sphingosine kinase." *J. Cell Biochem.* 60:529-537.

Pavese, J. M., R. L. Farmer und R. C. Bergan. 2010. "Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein." *Cancer Metastasis Rev.* 29:465-482.

Peest, U., S. C. Sensken, P. Andreani, P. Hanel, P. P. van Veldhoven und M. H. Gräler. 2008. "S1P-lyase independent clearance of extracellular sphingosine-1-phosphate after dephosphorylation and cellular uptake." *J. Cell Biochem.* 104:756-772.

Penela, P., C. Murga, C. Ribas, V. Lafarga und F. Mayor, Jr. 2010. "The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets." *Br. J. Pharmacol.* 160:821-832.

Penela, P., C. Ribas und F. Mayor, Jr. 2003. "Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases." *Cell Signal.* 15:973-981.

Peralta, E. G., A. Ashkenazi, J. W. Winslow, D. H. Smith, J. Ramachandran und D. J. Capon. 1987. "Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors." *EMBO J.* 6:3923-3929.

Piali, L., S. Froidevaux, P. Hess, O. Nayler, M. H. Bolli, E. Schlosser, C. Kohl, B. Steiner und M. Clozel. 2011. "The selective sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist ponesimod protects against lymphocyte-mediated tissue inflammation." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 337:547-556.

Pitcher, J. A., J. Inglese, J. B. Higgins, J. L. Arriza, P. J. Casey, C. Kim, J. L. Benovic, M. M. Kwatra, M. G. Caron und R. J. Lefkowitz. 1992. "Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors." *Science.* 257:1264-1267.

Pitson, S. M. 2011. "Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling." *Trends Biochem. Sci.* 36:97-107.

Pitson, S. M., R. J. D'Andrea, L. Vandeleur, P. A. Moretti, P. Xia, J. R. Gamble, M. A. Vadas und B. W. Wattenberg. 2000. "Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes." *Biochem. J.* 350 Pt 2:429-441.

Pitson, S. M., P. A. Moretti, J. R. Zebol, H. E. Lynn, P. Xia, M. A. Vadas und B. W. Wattenberg. 2003. "Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation." *EMBO J.* 22:5491-5500.

Pyne, N. J. und S. Pyne. 2010. "Sphingosine-1-phosphate and cancer." *Nat. Rev. Cancer.* 10:489-503.

Ren, S., C. Xin, J. Pfeilschifter und A. Huwiler. 2010. "A novel mode of action of the putative sphingosine kinase inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl) thiazole (SKI-II): induction of lysosomal sphingosine kinase 1 degradation." *Cell Physiol Biochem.* 26:97-104.

Rhee, S.G. 2001. "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C." *Annu. Rev. Biochem.* 70:281-312.

Ribas, C., P. Penela, C. Murga, A. Salcedo, C. Garcia-Hoz, M. Jurado-Pueyo, I. Aymerich, F. Mayor Jr. 2007. "The G-protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling." *Biochim. Biophys. Acta.* 1768:913-922.

- Rojas, R. J., M. E. Yohe, S. Gershburg, T. Kawano, T. Kozasa und J. Sondek. 2007. "Gα₁₂ directly activates p115RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain." *J. Biol. Chem.* 282:29201-29210.
- Rosenbaum, D. M., S. G. Rasmussen und B. K. Kobilka. 2009. "The structure and function of G-protein-coupled receptors." *Nature.* 459:356-363.
- Rothe, M., J. Xiong, H. B. Shu, K. Williamson, A. Goddard und D. V. Goeddel. 1996. "I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:8241-8246.
- Rümenapp, U., M. Schmidt, S. Olesch, S. Ott, C. V. Eichel-Streiber und K. H. Jakobs. 1998. "Tyrosine-phosphorylation-dependent and rho-protein-mediated control of cellular phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels." *Biochem. J.* 334 (Pt 3):625-631.
- Salomone, S., E. M. Potts, S. Tyndall, P. C. Ip, J. Chun, V. Brinkmann und C. Waeber. 2008. "Analysis of sphingosine-1-phosphate receptors involved in constriction of isolated cerebral arteries with receptor null mice and pharmacological tools." *Br. J. Pharmacol.* 153:140-147.
- Sandhoff, K., T. Kolter und G. van Echten-Deckert. 1998. "Sphingolipid metabolism. Sphingoid analogs, sphingolipid activator proteins, and the pathology of the cell." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845:139-151.
- Sato, K., E. Malchinkhuu, Y. Horiuchi, C. Mogi, H. Tomura, M. Tosaka, Y. Yoshimoto, A. Kuwabara und F. Okajima. 2007. "Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine-1-phosphate release from astrocytes." *J. Neurochem.* 103:2610-2619.
- Schmidt, H., R. Schmidt und G. Geisslinger. 2006. "LC-MS/MS-analysis of sphingosine-1-phosphate and related compounds in plasma samples." *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 81:162-170.
- Schwab, S. R., J. P. Pereira, M. Matloubian, Y. Xu, Y. Huang und J. G. Cyster. 2005. "Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients." *Science.* 309:1735-1739.

Sethakorn, N., D. M. Yau und N. O. Dulin. 2010. "Non-canonical functions of RGS proteins." *Cell Signal*. 22:1274-1281.

Shankaranarayanan, A., C. A. Boguth, S. Lutz, C. Vettel, F. Uhlemann, M. Aittaleb, T. Wieland und J. J. Tesmer. 2010. "Galpha q allosterically activates and relieves autoinhibition of p63RhoGEF." *Cell Signal*. 22:1114-1123.

Shankaranarayanan, A., D. M. Thal, V. M. Tesmer, D. L. Roman, R. R. Neubig, T. Kozasa und J. J. Tesmer. 2008. "Assembly of high order G alpha q-effector complexes with RGS proteins." *J. Biol. Chem*. 283:34923-34934.

Skoura, A. und T. Hla. 2009a. "Lysophospholipid receptors in vertebrate development, physiology, and pathology." *J. Lipid Res*. 50 Suppl:S293-S298.

Skoura, A. und T. Hla. 2009b. "Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P₂ receptor subtype." *Cardiovasc. Res*. 82:221-228.

Smrcka, A. V. 2008. "G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling." *Cell Mol. Life Sci*. 65:2191-2214.

Smrcka, A. V., J. R. Hepler, K. O. Brown und P. C. Sternweis. 1991. "Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq." *Science*. 251:804-807.

Spiegel, S. und S. Milstien. 2003. "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 4:397-407.

Stahelin, R. V., J. H. Hwang, J. H. Kim, Z. Y. Park, K. R. Johnson, L. M. Obeid und W. Cho. 2005. "The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1." *J. Biol. Chem*. 280:43030-43038.

Stols, L., M. Gu, L. Dieckman, R. Raffin, F. R. Collart und M. I. Donnelly. 2002. "A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site." *Protein Expr. Purif*. 25:8-15.

Strub, G. M., M. Paillard, J. Liang, L. Gomez, J. C. Allegood, N. C. Hait, M. Maceyka, M. M. Price, Q. Chen, D. C. Simpson, T. Kordula, S. Milstien, E. J. Lesnefsky und S. Spiegel. 2011. "Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration." *FASEB J.* 25:600-612.

Takabe, K., R. H. Kim, J. C. Allegood, P. Mitra, S. Ramachandran, M. Nagahashi, K. B. Harikumar, N. C. Hait, S. Milstien und S. Spiegel. 2010. "Estradiol induces export of sphingosine-1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2." *J. Biol. Chem.* 285:10477-10486.

Takabe, K., S. W. Paugh, S. Milstien und S. Spiegel. 2008. "'Inside-out' signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets." *Pharmacol. Rev.* 60:181-195.

ter Braak, M., R. F. Claas, B. Hegen, S. Labocha, N. Ferreiros, J. Pfeilschifter, A. Huwiler, G. van Echten-Deckert und D. Meyer zu Heringdorf. 2011. "Cis-4-methylsphingosine is a sphingosine-1-phosphate receptor modulator." *Biochem. Pharmacol.* 81:617-625.

ter Braak, M., K. Danneberg, K. Lichte, K. Liphardt, N. T. Ktistakis, S. M. Pitson, T. Hla, K. H. Jakobs und D. Meyer zu Heringdorf. 2009. "G α (q)-mediated plasma membrane translocation of sphingosine kinase-1 and cross-activation of S1P receptors." *Biochim. Biophys. Acta.* 1791:357-370.

ter Braak, M. 2008. "Regulation zellulärer Funktionen durch Enzyme des Sphingosin-1-Phosphat-Metabolismus." Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Universität Duisburg-Essen.

Tesmer, V. M., T. Kawano, A. Shankaranarayanan, T. Kozasa und J. J. Tesmer. 2005. "Snapshot of activated G proteins at the membrane: the G α q-GRK2-Gbetagamma complex." *Science.* 310:1686-1690.

Thudichum, J. L. W. 1884. "A treatise on the chemical constitution of the brain." *London, Bailliere, Tindall, and Cox.*

Van Raamsdonk, C. D., V. Bezrookove, G. Green, J. Bauer, L. Gaugler, J. M. O'Brien, E. M. Simpson, G. S. Barsh und B. C. Bastian. 2009. "Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi." *Nature*. 457:599-602.

Venkatakrishnan, G. und J. H. Exton. 1996. "Identification of determinants in the alpha-subunit of Gq required for phospholipase C activation." *J. Biol. Chem.* 271:5066-5072.

Venkataraman, K., Y. M. Lee, J. Michaud, S. Thangada, Y. Ai, H. L. Bonkovsky, N. S. Parikh, C. Habrukowich und T. Hla. 2008. "Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine-1-phosphate." *Circ. Res.* 102:669-676.

Vlahos, C. J. , W. F. Matter, K. Y. Hui und R. F. Brown. 1994. "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)." *J. Biol. Chem.* 269:5241-5248.

Vogel, P., M. S. Donoviel, R. Read, G. M. Hansen, J. Hazlewood, S. J. Anderson, W. Sun, J. Swaffield und T. Oravec. 2009. "Incomplete inhibition of sphingosine-1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions." *PLoS. One*. 4:e4112.

Wang, W., M. H. Gräler und E. J. Goetzl. 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.

Weber, C., A. Krueger, A. Munk, C. Bode, P. P. van Veldhoven und M. H. Gräler. 2009. "Discontinued postnatal thymocyte development in sphingosine-1-phosphate-lyase-deficient mice." *J. Immunol.* 183:4292-4301.

Weinert, F. M., C. B. Mast und D. Braun. 2011. "Optical fluid and biomolecule transport with thermal fields." *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13:9918-9928.

Wettschureck, N. und S. Offermanns. 2005. "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." *Physiol Rev.* 85:1159-1204.

Wienken, C. J., P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun und S. Duhr. 2010. "Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis." *Nat. Commun.* 1:100.

Xia, P., L. Wang, P. A. Moretti, N. Albanese, F. Chai, S. M. Pitson, R. J. D'Andrea, J. R. Gamble und M. A. Vadas. 2002. "Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling." *J. Biol. Chem.* 277:7996-8003.

Yatomi, Y., Y. Igarashi, L. Yang, N. Hisano, R. Qi, N. Asazuma, K. Satoh, Y. Ozaki und S. Kume. 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.

Yonesu, K., K. Kubota, M. Tamura, S. Inaba, T. Honda, C. Yahara, N. Watanabe, T. Matsuoka und F. Nara. 2011. "Purification and identification of activating enzymes of CS-0777, a selective sphingosine-1-phosphate receptor 1 modulator, in erythrocytes." *J. Biol. Chem.* 286:24765-24775.

Zhang, W., J. Wang, Y. Zhang, Y. Yuan, W. Guan, C. Jin, H. Chen, X. Wang, X. Yang und F. He. 2010. "The scaffold protein TANK/I-TRAF inhibits NF-kappaB activation by recruiting polo-like kinase 1." *Mol. Biol. Cell.* 21:2500-2513.

7. Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| ABC-Transporter | <i>ATP-binding cassette transporter</i> |
| AUC | <i>area under the curve</i> / Fläche unterhalb der Kurve |
| BP | Bandpassfilter |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bspw. | beispielsweise |
| bzw. | beziehungsweise |
| $[Ca^{2+}]_i$ | intrazelluläre Calciumkonzentration |
| DAG | Diacylglycerol |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DMEM/F12 | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium; Nutrient Mixture F-12</i> / Nährmedium nach Dulbecco |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> / Deoxyribonucleinsäure |
| DPBS | <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> / phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| E.coli | Escherichia coli |
| Edg | <i>endothelial differentiation gene</i> |
| EDTA | <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> / Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> / epidermaler Wachstumsfaktor |
| EGTA | <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> / Ethylenglycoltetraessigsäure |
| Em | Emission |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| ERK | <i>extracellular signal-regulated kinase</i> |
| Ex | Exzitation |
| f.c. | <i>final concentration</i> / Endkonzentration |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> / fetales Kälberserum |
| FRET | <i>fluorescence resonance energy transfer</i> / Förster- Resonanzenergietransfer |
| GAP | GTPase-aktivierendes Protein |
| GEF | <i>guanine nucleotide exchange factors</i> / Guaninnukleotid- Austauschfaktoren |
| ggf. | gegebenenfalls |

| | |
|------------------|--|
| GPCR | <i>G-protein coupled receptor</i> / G-Protein gekoppelter Rezeptor |
| GRK | G-Protein gekoppelter Rezeptorkinase |
| HBSS | <i>Hank's Buffered Salt Solution</i> / gepufferte Salzlösung nach Hank |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HEK-293-Zellen | <i>human embryonic kidney cells</i> / menschliche embryonale Nierenzellen |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| IGF | <i>insulin-like growth factor</i> / insulinähnlicher Wachstumsfaktor |
| IP | Inositolmonophosphat |
| IP ₂ | Inositolbisphosphat |
| IP ₃ | Inositoltrisphosphat |
| IPTG | Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid |
| LB | <i>lysogeny broth</i> / Nährmedium für Bakterien |
| LC-MS/MS | <i>liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i> / Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung |
| LIC | <i>ligation-independent cloning</i> / Ligationsunabhängige Klonierung |
| LP | Langpassfilter |
| LPA | <i>lysophosphatidic acid</i> / Lysophosphatidsäure |
| LPP | Lysophosphatidphosphatase |
| LSM | Laserscanningmikroskop |
| MBP | Maltose-bindendes Protein |
| MEF | <i>mouse embryonic fibroblast</i> / embryonale Fibroblasten der Maus |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| MST | Microscale Thermophorese |
| NBD-Sph | Nitrobenzoxadiazol-Sphingosin |
| NF-κB | nukleärer Faktor κB |
| OD | optische Dichte |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> / Polymerasekettenreaktion |
| PDGF | <i>platelet-derived growth factor</i> / Wachstumsfaktor aus Blutplättchen |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PIP ₂ | Phosphoinositolbisphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKD | Proteinkinase D |
| PLC | Phospholipase C |

| | |
|---------------|---|
| R | Rezeptor |
| RGS | <i>regulator of G-protein signalling</i> / Regulatormolekül der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion |
| RH | RGS-Homologie |
| RU | <i>relative unit</i> / relative Einheit |
| S1P | Sphingosin-1-Phosphat |
| SDS | <i>sodium dodecylsulfate</i> / Natriumdodecylsulfat |
| SERCA | <i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i> / Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums |
| SK1 | Sphingosinkinase-1 |
| SK2 | Sphingosinkinase-2 |
| SKI-II | Sphingosinkinaseinhibitor 2-(p-Hydroxyanilino)-4-(p-Chlorophenyl)-thiazol |
| sog. | sogenannt/e |
| SPP | S1P-Phosphatase |
| SPT | Serinpalmitoyltransferase |
| TANK | <i>TRAF family member-associated NF-κB activator</i> |
| TEV | <i>tobacco etch virus</i> / Tabakätzvirus |
| TGF- β | <i>transforming growth factor-β</i> / transformierender Wachstumsfaktor- β |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TRAF | <i>TNF receptor-associated factor</i> / TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> / Gefäßendothel-stimulierender Wachstumsfaktor |

8. Eigene Publikationen

8.1. Originalpublikationen

Claas, R. F., M. ter Braak, B. Hegen, V. Hardel, C. Angioni, H. Schmidt, K. H. Jakobs, P. P. van Veldhoven und D. Meyer zu Heringdorf. 2010. "Enhanced Ca^{2+} storage in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts." *Cell Signal.* 22:476-483.

ter Braak, M., R. F. Claas, B. Hegen, S. Labocha, N. Ferreiros, J. Pfeilschifter, A. Huwiler, G. van Echten-Deckert und D. Meyer zu Heringdorf. 2011. "Cis-4-methylsphingosine is a sphingosine-1-phosphate receptor modulator." *Biochem. Pharmacol.* 81:617-625.

8.2. Kongressbeiträge

Claas, R. F., K. Ihlefeld, E. Kostenis, S. Offermanns, T. Wieland und D. Meyer zu Heringdorf. 2010. " $\text{G}\alpha_q$ mediates Sphingosine kinase-1 translocation by G protein-coupled receptors." 8th International Sphingolipid Club Meeting, Glasgow (Poster). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 383(1):69. **Posterpreis**

Ihlefeld, K., R. F. Claas, M. ter Braak, A. Koch, J. Pfeilschifter, P. P. van Veldhoven und D. Meyer zu Heringdorf. 2010. "Inhibition of histone deacetylases contributes to the phenotype of sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts." 8th International Sphingolipid Club Meeting, Glasgow (Poster). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 383(1):69.

Claas, R. F., K. Ihlefeld, E. Kostenis, S. Offermanns, T. Wieland und D. Meyer zu Heringdorf. 2011. " $\text{G}\alpha_q$ mediates the plasma membrane translocation of Sphingosine kinase-1 by GPCRs." 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

Ihlefeld, K., R. F. Claas, A. Koch, P. P. van Veldhoven und D. Meyer zu Heringdorf. 2011. "HDAC inhibition contributes to the phenotype of S1P lyase-deficient fibroblasts." 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

9. Erklärung

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

Frankfurt am Main, im März 2012

Ralf Frederik Claas

10. Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Ralf Frederik Claas
Geburtsdatum: 9. Juni 1983
Geburtsort: Krefeld
Anschrift: Zum Gipelhof 8
60594 Frankfurt am Main



Schulbildung

08/1990 – 06/1993 Overberg-Grundschule, Warendorf
08/1993 – 06/2002 Gymnasium Laurentianum, Warendorf
08/1999 – 02/2000 Cimarron High School, Cimarron, USA

Wehrdienst

07/2002 – 03/2003 3./PzArtLBtl 325, Schwanewede

Studium und Ausbildung

04/2003 – 04/2007 Pharmaziestudium an der Philipps-Universität, Marburg
05/2007 – 10/2007 AstraZeneca Operations, Wedel
11/2007 – 08/2008 Delphin-Apotheke, Paderborn

Staatsexamen

04/2005 1. Staatsexamen
04/2007 2. Staatsexamen
05/2008 3. Staatsexamen
07/2008 Approbation als Apotheker

Promotion

09/2008 – 10/2011 Promotion am Institut für allgemeine Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Medizin