

University of Groningen

## Regulation of sphingolipid transport in mammalian cells

Zegers, Mirjam Maartje Petronella

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1997

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Zegers, M. M. P. (1997). Regulation of sphingolipid transport in mammalian cells s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## SAMENVATTING

### REGULERING VAN SFINGOLIPIDEN TRANSPORT IN ZOOGDIERCELLEN

Het onderzoek dat in dit proefschrift is beschreven heeft zich gericht op de regulering van intracellulair sfingolipiden transport in gekweekte zoogdiercellen. Sfingolipiden, ook wel glycosfingolipiden genoemd als ze suikers bevatten, zijn een speciale klasse van lipiden die in het Golgi apparaat, worden gesynthetiseerd. Ceramide, dat gesynthetiseerd wordt in het endoplasmatisch reticulum, dient daartoe als een basismolecuul ('precursor'). Na hun synthese worden de sfingolipiden van het Golgi apparaat naar het celoppervlak getransporteerd. Deze lipiden bevinden zich dan ook voornamelijk op het celoppervlak en er wordt aangenomen dat zij daar specifieke functies vervullen. Zo spelen ze bijvoorbeeld een belangrijke rol in de overdracht van signalen, afkomstig van externe stimuli, naar het intracellulaire milieu.

In epitheel cellen zijn (glyco)sfingolipiden niet gelijkmatig over het totale cel membraan verdeeld. Het celmembraan van deze cellen is namelijk gepolariseerd. Dat wil zeggen dat ze twee verschillende kanten hebben: de ene kant (apicaal domein) grenst aan lichaamsholten, terwijl de andere kant (basolateraal domein) aan het onderliggende weefsel of de bloedcirculatie grenst. (Glyco)sfingolipiden bevinden zich voornamelijk in het apicale celmembraan van epitheel cellen, waar zij wellicht ook een rol spelen in de bescherming van de cel tegen het extracellulaire milieu. Het feit dat cellen in staat zijn om sfingolipiden naar (gespecialiseerde delen van) het plasma membraan te transporteren, en ze daar ook te houden, suggereert dat de cel in staat is deze lipiden te sorteren en dat hun intracellulaire transport op de één of andere manier is gereguleerd.

Om de regulering van de bovenstaande processen te kunnen bestuderen, is gebruik gemaakt van sfingolipide derivaten met een radioactief of fluorescent gelabelde, kortketenige vetzuurstaart. Deze lipide derivaten worden via exogene toevoeging in het membraan geïncorporeerd. Door de aanwezigheid van het label kan hun intracellulair transport vervolgens worden bestudeerd. Uit voorafgaand onderzoek is gebleken dat fluorescente, NBD-gelabelde sfingolipide derivaten goed bruikbare merkers zijn om het intracellulaire transport van sfingolipiden te bestuderen met behulp van een fluorescentie microscoop. In een deel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek is dan ook gebruik gemaakt van deze derivaten. Echter, bij gebruik van deze methode is het niet mogelijk om componenten die als gevolg van een rechtstreekse moleculaire interactie betrokken zijn bij lipide transport of sortering, te identificeren. Om dit soort factoren, en dan met name eiwitten, te identificeren, is gebruik gemaakt van een ander type sfingolipide derivaten, namelijk de fotoactiveerbare sfingolipide analogen.

In hoofdstuk 2 is de synthese van fotoactiveerbare analogen van glucosylceramide (GlcCer), sfingomyeline (SM) en ceramide beschreven. Deze analogen zijn vetzuur-gela-

beled met een radioactieve, fotoreactieve groep, die in het donker chemisch stabiel is, maar door belichting met UV-straling kan worden omgezet in een sterk reactieve groep die zich covalent aan nabijgelegen moleculen kan binden. Het intracellulaire gedrag van deze analogen is gekarakteriseerd in een humane en een hamster tumor cellijn. In tegenstelling tot het fotoactiveerbare GlcCer ( $^{125}\text{I-N}_3\text{-GlcCer}$ ) en het fotoactiveerbare SM ( $^{125}\text{I-N}_3\text{-SM}$ ), welke hoogstwaarschijnlijk via een endocytotisch proces door de cel worden opgenomen, kan het fotoactiveerbare ceramide ( $^{125}\text{I-N}_3\text{-Cer}$ ) via monomere diffusie het intracellulaire milieu bereiken.  $^{125}\text{I-N}_3\text{-Cer}$  kan bovendien door de cellen gebruikt worden als een sfin-golipide 'precursor', en wordt voornamelijk gemetaboliseerd tot  $^{125}\text{I-N}_3\text{-SM}$ . Dit nieuw gesynthetiseerde  $^{125}\text{I-N}_3\text{-SM}$  wordt vervolgens door middel van membraan vesicles naar het plasma membraan getransporteerd.

Experimenten die er op gericht waren om eiwitten te identificeren die betrokken zijn bij de sortering en/of het transport van het nieuw gesynthetiseerde  $^{125}\text{I-N}_3\text{-SM}$ , zijn vervolgens uitgevoerd in een humane lever tumor cellijn (HepG2). Een groot deel van deze cellen zijn gepolariseerd en vormen in kweek een grote vacuole tussen twee tegen elkaar aan liggende cellen. Het deel van het plasma membraan dat deze vacuole omsluit is analoog aan het galcanaliculaire (apicale) membraan van de lever. Uit dit en eerder onderzoek is naar voren gekomen dat zowel in humane levercellen als in HepG2 cellen, nieuw gesynthetiseerde sfin-golipiden vanaf het Golgi apparaat naar dit galcanaliculaire membraan domein worden getransporteerd. In hoofdstuk 3 wordt beschreven dat ook in deze cellen, het  $^{125}\text{I-N}_3\text{-Cer}$  voornamelijk wordt omgezet in  $^{125}\text{I-N}_3\text{-SM}$ . Wanneer HepG2 cellen met  $^{125}\text{I-N}_3\text{-Cer}$  werden geïncubeerd en vervolgens werden bestraald met UV, resulteerde dit, door activatie van het  $^{125}\text{I-N}_3\text{-Cer}$  en het nieuw gevormde  $^{125}\text{I-N}_3\text{-SM}$ , in de radioactieve labeling van een aantal eiwitten. Echter, wanneer dit experiment werd herhaald in de aanwezigheid van een remmer van de synthese van  $^{125}\text{I-N}_3\text{-SM}$ , dan bleek de labeling van een specifiek eiwit van 60 kD sterk verminderd te zijn ten opzichte van de labeling die werd verkregen wanneer deze remmer niet was toegevoegd. Dit suggereert dat dit eiwit een interactie aangaat met het nieuw gevormde  $^{125}\text{I-N}_3\text{-SM}$ , maar niet met  $^{125}\text{I-N}_3\text{-Cer}$ . Of dit eiwit van 60 kD een specifieke, functionele rol speelt in de regulering van SM transport, is op dit moment nog niet duidelijk. Er zijn echter aanwijzingen gevonden die suggereren dat één of meer van de eiwitten die een interactie aangaan met de fotoactiveerbare sfin-golipide analogen, inderdaad een rol spelen bij het intracellulaire transport van sfin-golipiden. Het bleek namelijk dat de, door UV geïnduceerde, eiwit-lipide interacties, het transport van fluorescente NBD-lipiden naar het galcanaliculaire membraan kon remmen.

Het transport van sfin-golipiden naar het apicale membraan domein van HepG2 cellen is verder onderzocht met behulp van fluorescente NBD-sfin-golipide analogen (hoofdstuk 4-6). Vastgesteld werd dat sfin-golipiden via twee verschillende routes naar dit

membraan domein kunnen worden getransporteerd. Eén route transporteert de nieuw gesynthetiseerde sfingolipiden GlcCer en SM vanaf het Golgi apparaat naar het apicale membraan. Deze transport route is hier aangegeven met de *directe* route. Echter, GlcCer en SM kunnen ook vanaf het basolaterale membraan naar het apicale membraan getransporteerd worden. Transport via deze route wordt *transcytose* genoemd. De gevoeligheid van beide transport routes voor diverse effectoren van intracellulair (eiwit) transport is onderzocht. Op deze manier is aangetoond dat de beide transport routes een verschillende gevoeligheid hebben voor stoffen die de integriteit van componenten van het cytoskelet (actine en microtubuli) aantasten. Ook is aangetoond dat verschillende proteïne kinases, zoals proteïne kinase C en proteïne kinase A, het sfingolipide transport naar het apicale domein kunnen reguleren. Deze kinases hebben een tegenovergesteld effect. Proteïne kinase C remt het transport, terwijl activatie van proteïne kinase A het sfingolipide transport stimuleert. Een interessante observatie was dat de effecten van de kinases op het sfingolipide transport correleerden met morfologische veranderingen van het apicale membraan domein. Het bleek dat een remming van het sfingolipide transport door proteïne kinase C gepaard ging met een verdwijning van het apicale domein in HepG2 cellen. Aan de andere kant ging de stimulatie van het sfingolipide transport door proteïne kinase A juist gepaard met een vergroting van het oppervlakte van het apicale membraan.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat een aantal factoren die het intracellulaire sfingolipiden transport beïnvloeden zijn geïdentificeerd. Verder onderzoek kan uitwijzen wat het precieze mechanisme is waarmee deze factoren het sfingolipide transport reguleren. In dit opzicht is met name de regulering van het lipide transport door proteïne kinase C en proteïne kinase A interessant, gegeven de correlatie tussen veranderingen in transport en de morfologie van het apicale cel membraan. Het is zeer waarschijnlijk dat de intracellulaire regulering van de genoemde kinases door externe stimuli gestuurd wordt. De kennis van intracellulaire 'targets' van deze kinases, zoals die uit dit onderzoek naar voren is gekomen, zal zeker een bijdrage kunnen leveren aan de identificatie van externe stimuli (en de membraan receptoren, waarop zij aangrijpen) als regulatoren van intracellulair sfingolipiden transport.