

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin  
Robert-Rössle-Straße 10  
13092 Berlin

Dissertation

# **Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor EDG6**

Markus Gräler

September 2000

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin



Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Juni 1997 bis September 2000 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martin Lipp der Abteilung Tumor- und Immunogenetik des Max-Delbrück-Centrums Berlin-Buch angefertigt.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martin Lipp selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Markus Gräler

Berlin, im September 2000

1. Gutachter: Herr PD Dr. Martin Lipp
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Udo Heinemann

Datum der Disputation: 19. Januar 2001

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Gräler, M. H., Bernhardt, G. und Lipp, M.** (1998): EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics*, 53: 164-9.

**Gräler, M. H., Bernhardt, G. und Lipp, M.** (1999): A lymphoid tissue-specific receptor, EDG6, with potential immune modulatory functions mediated by extracellular lysophospholipids. *Curr Top Microbiol Immunol*, 246: 131-6.

**Van Brocklyn, J. R., Gräler, M. H.\*, Bernhardt, G., Hobson, J. P., Lipp, M. und Spiegel, S.** (2000): Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6. *Blood*, 95: 2624-9. (\*J.R.V.B. und M.H.G. sind gleichwertige Autoren dieser Studie.)



„Nichts schockiert mich, ich bin Wissenschaftler!“

*Indiana Jones*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
1.1	G-Protein-gekoppelte Signalübertragung . . . . .	1
1.1.1	Rezeptoren . . . . .	1
1.1.2	Heterotrimere G-Proteine . . . . .	5
1.1.3	Effektoren . . . . .	7
1.2	Die EDG-Rezeptorfamilie . . . . .	9
1.3	Lysophospholipide . . . . .	11
1.4	Der EDG6-Rezeptor . . . . .	13
1.5	Problemstellung . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
2.1	Bakterien . . . . .	15
2.2	Vektoren genomischer DNA-Banken . . . . .	15
2.3	Plasmide . . . . .	16
2.4	RNA und DNA . . . . .	17
2.5	Zellen . . . . .	18
2.6	Mäuse . . . . .	18
2.7	Oligonukleotide . . . . .	18
2.8	Enzyme . . . . .	20
2.9	Chemikalien . . . . .	20
2.10	Antikörper . . . . .	22
2.11	Geräte und sonstige Materialien . . . . .	22
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>25</b>
3.1	Bakterienkulturen . . . . .	25
3.1.1	Lagerung und Reaktivierung von Bakterienkulturen . . . . .	25

3.1.2	Plattenkulturen . . . . .	25
3.1.3	Flüssigkulturen . . . . .	26
3.2	Kultur von Säugetierzellen . . . . .	26
3.2.1	Lagerung und Reaktivierung von Stammkulturen . . . . .	26
3.2.2	Kultivierung von Zelllinien . . . . .	27
3.2.3	Kultivierung und Inaktivierung von embryonalen Fibroblastenzellen . . . . .	27
3.2.4	Kultivierung von embryonalen Stammzellen . . . . .	28
3.2.5	Elektroporation und Selektion von embryonalen Stammzellen . . . . .	29
3.2.6	Isolierung G418-resistenter embryonaler Stammzellklone . . . . .	30
3.2.7	Isolierung und Kultivierung primärer muriner Milzzellen . . . . .	30
3.2.8	Zellzahlbestimmung . . . . .	31
3.3	Proteinexpression in <i>E. coli</i> . . . . .	31
3.3.1	Induktion der Proteinexpression . . . . .	31
3.3.2	Bakterienaufschluß . . . . .	32
3.3.3	Proteinreinigung durch Affinitätschromatografie . . . . .	32
3.4	Proteinexpression in Säugetierzellen . . . . .	33
3.4.1	Transfektion von Säugetierzellen . . . . .	34
3.4.2	Selektion stabil exprimierender Zelllinien . . . . .	35
3.4.3	Isolierung membranständiger Proteine . . . . .	36
3.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen . . . . .	36
3.5.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung bei 280nm . . . . .	36
3.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	37
3.6	Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen . . . . .	37
3.6.1	Glycingele . . . . .	37
3.6.2	Tricingele . . . . .	38
3.6.3	Harnstoffgele . . . . .	39
3.7	Färbung von Proteingelen . . . . .	39
3.7.1	Coomassie-Färbung . . . . .	39
3.7.2	Silberfärbung . . . . .	40
3.8	Transfer und Nachweis von Proteinen auf PDVF-Membranen . . . . .	40
3.8.1	Transfer nach der Western-Blot-Methode . . . . .	40
3.8.2	Immundetektion von Proteinen . . . . .	41
3.8.3	Abwaschen gebundener Antikörper . . . . .	42
3.9	Reinigungsmethoden für Nukleinsäuren . . . . .	42



---

3.9.1	Phenolextraktion von Proteinen . . . . .	42
3.9.2	Ethanolpräzipitation von DNA und RNA . . . . .	43
3.9.3	Abtrennung von Oligonukleotiden in DNA-Präparationen . . . . .	43
3.10	Amplifizierung von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	43
3.10.1	Synthese einzelsträngiger cDNA für die PCR . . . . .	43
3.10.2	Amplifizierung von DNA mittels PCR . . . . .	44
3.10.3	Amplifizierung von 5'-cDNA-Enden mittels RACE-PCR . . . . .	44
3.11	Trennmethoden für Nucleinsäuren . . . . .	45
3.11.1	DNA-Trennung durch Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	45
3.11.2	DNA-Trennung durch Polyacrylamid-Harnstoffgele . . . . .	46
3.11.3	RNA-Trennung durch Formamid-Agarosegele . . . . .	47
3.12	Durchmustern einer Genbank . . . . .	48
3.13	Transfer von Nucleinsäuren auf Nitrozellulose- oder Nylonmembranen . . . . .	48
3.13.1	DNA-Transfer mittels Southern-Blot-Methode . . . . .	48
3.13.2	RNA-Transfer mittels Northern-Blot-Methode . . . . .	49
3.13.3	Transfer von Phagen-DNA . . . . .	50
3.14	Spezifische Detektion von Nucleinsäuren durch Hybridisierung . . . . .	50
3.14.1	Markierung von DNA-Fragmenten . . . . .	50
3.14.2	Hybridisierung von Nucleinsäuren mit markierten DNA-Fragmenten . . . . .	51
3.14.3	Detektion markierter DNA-Fragmente . . . . .	53
3.14.4	Abwaschen hybridisierter Proben . . . . .	53
3.15	Isolierungsmethoden für Nucleinsäuren . . . . .	54
3.15.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	54
3.15.2	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	54
3.15.3	Isolierung genomischer DNA . . . . .	56
3.16	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren . . . . .	56
3.16.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung bei 260nm . . . . .	56
3.16.2	Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	56
3.17	Enzymatische Reaktionen an DNA . . . . .	57
3.17.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen . . . . .	57
3.17.2	Abspaltung von 5'-Phosphatresten durch alkalische Phosphatase . . . . .	57
3.17.3	Herstellen von glatten Enden an DNA-Fragmenten . . . . .	57
3.17.4	3'-Polyadenylierung von DNA mittels terminaler Transferase . . . . .	57
3.18	Klonierung von DNA . . . . .	58

3.18.1	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	58
3.18.2	Präparation transformationskompetenter Bakterien . . . . .	58
3.18.3	Transformation durch Elektroporation . . . . .	58
3.19	Sequenzierung von Plasmid-DNA . . . . .	59
3.20	Durchflußzytometrie . . . . .	59
3.20.1	Fixierung und Permeabilisierung . . . . .	59
3.20.2	Immunfluoreszenzfärbung . . . . .	60
3.20.3	Propidiumiodid-Färbung toter Zellen . . . . .	60
3.20.4	Analyse . . . . .	60
3.21	Immunfluoreszenzfärbung von Säugetierzellen . . . . .	61
3.21.1	Kultivierung . . . . .	61
3.21.2	Fixierung . . . . .	61
3.21.3	Permeabilisierung . . . . .	61
3.21.4	Immunfluoreszenzfärbung . . . . .	61
3.21.5	Mikroskopie . . . . .	61
3.22	Migrationsexperimente . . . . .	62
3.23	Luziferase-Assay . . . . .	62
3.24	Calcium-Assay . . . . .	63
3.25	Datenverarbeitung . . . . .	63
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>65</b>
4.1	Identifizierung des murinen EDG6-Rezeptors . . . . .	65
4.1.1	Primer-Design . . . . .	66
4.1.2	5'-RACE-PCR . . . . .	67
4.1.3	Kodierende Sequenz und Homologie . . . . .	67
4.2	Herstellung <i>edg6</i> -defizienter Mäuse . . . . .	67
4.2.1	Subklonierung der murinen genomischen <i>edg6</i> -DNA . . . . .	70
4.2.2	Herstellung des <i>edg6</i> -defizienten Vektorkonstrukts . . . . .	71
4.2.3	Generierung homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen . . . . .	72
4.2.4	Selektion homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen . . . . .	72
4.2.5	Blastozysten-Injektion und Uterus-Transfer . . . . .	75
4.3	RNA-Expression des EDG6-Rezeptors . . . . .	76
4.3.1	<i>edg6</i> -mRNA-Expression in humanen Zelllinien . . . . .	76
4.3.2	<i>edg6</i> -mRNA-Expression in humanen Geweben . . . . .	77

---

4.3.3	<i>edg6</i> -mRNA-Expression in murinen Geweben . . . . .	78
4.4	Genomische Lokalisation . . . . .	78
4.4.1	Genomische Lokalisation des humanen EDG6-Rezeptors . . . . .	78
4.4.2	Genomische Lokalisation des murinen EDG6-Rezeptors . . . . .	80
4.5	Proteinexpression Epitop-markierter EDG6-Rezeptoren . . . . .	81
4.6	Herstellung monoklonaler Antikörper . . . . .	82
4.6.1	Generierung rekombinanter Proteine . . . . .	82
4.6.2	Generierung stabil EDG6 überexprimierender Rattenzelllinien . . . . .	85
4.6.3	Fusion, Subklonierung und Selektion von Hybridomzellen . . . . .	86
4.7	Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen murinen EDG6-Rezeptor . . . . .	87
4.7.1	FACS-Analysen überexprimierender Zelllinien . . . . .	88
4.7.2	FACS-Analysen muriner Zelllinien . . . . .	89
4.7.3	FACS-Analysen primärer muriner Milzzellen . . . . .	90
4.7.4	Western-Blots überexprimierender Zelllinien . . . . .	91
4.7.5	Western-Blots primärer muriner Gewebeproteine . . . . .	92
4.8	Identifizierung des Liganden für EDG6 . . . . .	92
4.8.1	Herstellung stabil überexprimierender HEK293 und CHO-K1-Zellen . . . . .	93
4.8.2	Bindung von Sphingosin-1-phosphat an EDG-6 . . . . .	94
4.9	Nachweis der G-Protein-Kopplung an EDG6 . . . . .	95
4.9.1	Vergleich des RNA-Expressionsmusters von EDG6 und G alpha 16 . . . . .	95
4.9.2	Stimulierungsabhängige G-Protein-Kopplung an EDG6 . . . . .	97
4.10	Signaltransduktion des EDG6-Rezeptors . . . . .	98
4.10.1	Aktivierung der MAP-Kinase . . . . .	98
4.10.2	Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration . . . . .	99
4.10.3	Aktivierung der Phospholipase C . . . . .	99
4.11	Zelluläre Effekte des EDG6-Rezeptors . . . . .	100
4.11.1	RhoA-abhängige Veränderungen des Zytoskeletts . . . . .	101
4.11.2	Migrationseffekte überexprimierender Jurkat-Zellen . . . . .	104
4.12	Regulation der Oberflächenexpression des EDG6-Rezeptors . . . . .	108
4.12.1	Rezeptorinternalisierung nach Sphingosin-1-phosphat-Stimulierung . . . . .	109
4.12.2	Stimulierungsabhängige Oberflächenexpression auf CHO-K1-Zellen . . . . .	110
4.12.3	Differentielle Oberflächenexpression auf HeLa-Zellen . . . . .	111
4.12.4	Oberflächenexpression des N-terminal Epitop-markierten EDG6-Rezeptors . . . . .	112

<b>5 Diskussion</b>	<b>115</b>
5.1 Vergleich des murinen und humanen EDG6 Proteins . . . . .	115
5.2 Gewebsspezifische <i>edg6</i> -mRNA-Expression . . . . .	117
5.3 Lokalisation des <i>edg6</i> -Gens . . . . .	118
5.4 Sphingosin-1-phosphat ist ein Ligand von EDG6 . . . . .	119
5.5 EDG6 koppelt an G-alpha-i und G-alpha-12/13 . . . . .	120
5.6 EDG6 aktiviert die MAP-Kinase und die Phospholipase C . . . . .	121
5.7 Zytoskelettveränderungen in CHO-K1-Zellen . . . . .	122
5.8 Pertussistoxin-sensitive Spontanmigration von Jurkat-Zellen . . . . .	123
5.9 Rezeptorinternalisierung von EDG6 auf HEK293-Zellen . . . . .	124
5.10 Stimulierungsabhängige Oberflächenexpression auf CHO-K1-Zellen . . . . .	126
5.11 Differentieller Oberflächentransport in HeLa-Zellen . . . . .	128
5.12 <i>edg6</i> -defiziente Mäuse als <i>in vivo</i> -Tiermodell . . . . .	130
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>133</b>
<b>7 Summary</b>	<b>135</b>
<b>8 Literatur</b>	<b>137</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>149</b>
<b>10 Danksagung</b>	<b>153</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schlangendiagramm G-Protein-gekoppelter Rezeptoren . . . . .	2
1.2	Anordnung der sieben Transmembrandomänen . . . . .	3
1.3	Phylogenetischer Vergleich der EDG-Rezeptoren . . . . .	14
4.1	cDNA-Vergleich von murinem <i>edg6</i> und dem Datenbankeintrag AA254425 . . . . .	65
4.2	Ergebnis der 5'-RACE-PCR . . . . .	66
4.3	Sequenz der murinen <i>edg6</i> -cDNA . . . . .	68
4.4	Vergleich der Aminosäuresequenzen von EDG-Rezeptoren . . . . .	69
4.5	PCR der murinen genomischen <i>edg6</i> -Phagenklone . . . . .	70
4.6	Restriktionsanalyse des murinen genomischen <i>edg6</i> -Bereiches . . . . .	71
4.7	Struktur des <i>edg6</i> -defizienten Vektorkonstrukts . . . . .	72
4.8	Sequenz des 5'-flankierenden genomischen <i>Pst</i> I-Fragments . . . . .	73
4.9	Übersicht der homologen Rekombination und der PCR-Selektion . . . . .	74
4.10	Southern-Blot selektierter ES-Zellklone . . . . .	75
4.11	Northern-Blot humaner Zelllinien . . . . .	76
4.12	Dot-Blot mit mRNA humaner Gewebe . . . . .	77
4.13	Northern-Blot muriner Gewebe . . . . .	78
4.14	DNA-Sequenzvergleich von humanem <i>edg6</i> und dem D19S120-Marker . . . . .	79
4.15	DNA-Sequenzvergleich von murinem <i>edg6</i> und dem <i>Gna15</i> -Gen . . . . .	80
4.16	Sequenzen der <i>myc</i> - und Hämagglutinin-Epitope . . . . .	81
4.17	FACS-Analysen Epitop-markierter EDG6-Rezeptoren . . . . .	82
4.18	GST-Fusionsprotein des humanen EDG6-N-Terminus . . . . .	83
4.19	Hexahistidin-markiertes Protein des murinen N-Terminus . . . . .	84
4.20	Stabil mit humanem EDG6- <i>myc</i> transfizierte RBL-Zellen . . . . .	85
4.21	FACS-Analyse mit den fünf positiven anti-murinen-EDG6 Hybridomüberständen . . . . .	86
4.22	FACS-Analysen mit den drei monoklonalen Antikörpern . . . . .	88

---

4.23 FACS-Analysen HA-EDG6-transfizierter Zellen . . . . .	89
4.24 FACS-Analysen und PCR der 80/1-Zelllinie . . . . .	90
4.25 FACS-Analysen primärer muriner Milzzellen . . . . .	91
4.26 Western-Blot der drei monoklonalen Antikörper . . . . .	92
4.27 Western-Blot mit Membranproteinen primärer muriner Gewebe . . . . .	93
4.28 Stabil mit humanem EDG6- <i>myc</i> transfizierte HEK293 und CHO-K1-Zellen . . . . .	94
4.29 Radioaktiver Bindungsassay . . . . .	95
4.30 mRNA-Expressionsvergleich von humanem <i>edg6</i> und <i>Gna16</i> . . . . .	96
4.31 Nachweis der spezifischen G-alpha-Kopplung . . . . .	97
4.32 Aktivierung der MAP-Kinase . . . . .	98
4.33 Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration . . . . .	100
4.34 Aktivierung der Phospholipase C . . . . .	101
4.35 Untersuchung der Zytoskelettveränderungen . . . . .	102
4.36 Rho-Abhängigkeit der untersuchten Zytoskelettveränderungen . . . . .	103
4.37 Stabil mit humanem EDG6- <i>myc</i> transfizierte Jurkat-Zellen . . . . .	104
4.38 Migration gegen Sphingosin-1-phosphat . . . . .	105
4.39 Pertussistoxin-abhängige Spontanmigration . . . . .	106
4.40 Bestimmung der CXCR4-Expression auf Jurkat-Zellklonen . . . . .	107
4.41 Migration von Jurkat-Zellklonen gegen SDF-1 . . . . .	108
4.42 Rezeptorinternalisierung von murinem EDG6 in HEK293-Zellen . . . . .	109
4.43 <i>myc</i> -Epitop-Färbung von stabil mit EDG6- <i>myc</i> transfizierten CHO-K1-Zellen . . . . .	110
4.44 EDG6-Oberflächenexpression auf transfizierten HeLa-Zellen . . . . .	111
4.45 Oberflächenexpression des N-terminal-markierten murinen EDG6-Rezeptors . . . . .	112
4.46 Oberflächenexpression des N-terminal-markierten humanen EDG6-Rezeptors . . . . .	113
5.1 Modell der möglichen Funktion von EDG6 . . . . .	130

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß der aus *in vitro*-differenzierten humanen und murinen dendritischen Zellen isolierte G-Protein-gekoppelte Rezeptor EDG6 auf mRNA-Ebene in hämatopoietischen und lymphatischen Geweben und Zelllinien sowie in der Lunge exprimiert wird. Das Expressionsmuster ist in Mensch und Maus identisch und läßt auf eine mögliche Funktion des EDG6-Rezeptors im Immunsystem schließen. Das humane *edg6*-Gen ist auf Chromosom 19p13.3, das murine Homolog auf Chromosom 10 jeweils hinter dem *Gna15/16*-Gen lokalisiert. Auf Proteinebene konnte der humane und der murine Rezeptor in der richtigen Orientierung auf der Oberfläche EDG6-transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Ferner sind drei monoklonale Antikörper hergestellt worden, die gegen den N-Terminus des murinen EDG6-Rezeptors gerichtet sind und deutliche Signale auf transfizierten Zellen zeigen, auf primären Zellen bislang jedoch keine eindeutigen Ergebnisse liefern.

Die Herstellung verschiedener stabil EDG6 überexprimierender Zelllinien ermöglichte Untersuchungen bezüglich des Liganden sowie der G-Protein-Kopplung und der Signaltransduktion von EDG6. Als ein spezifischer Ligand konnte Sphingosin-1-phosphat mit der moderaten Bindungskonstante von 63nM ermittelt werden. Die Stimulierung von EDG6 führt zur Aktivierung von  $G_{\alpha i}$ - und  $G_{\alpha 12/13}$ -Untereinheiten trimärer G-Proteine. Über die  $G_{\alpha i}$ -Untereinheiten werden anschließend die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 sowie die Phospholipase C aktiviert. Ferner führt die Stimulierung des EDG6-Rezeptors zu deutlichen Zytoskelettveränderungen, die sich in einer erhöhten Anzahl peripherer Streßfasern, abgerundeter Zellen und besonders langer Filopodien äußern und vermutlich über  $G_{\alpha 12/13}$  und Rho-GTPase-vermittelte intrazelluläre Signalwege induziert werden. Eine gewisse Pertussistoxin-sensitive und Liganden-unabhängige Basalaktivität des EDG6-Rezeptors ist in EDG6 überexprimierenden Jurkat-Zellen festzustellen, die eine deutlich erhöhte Spontanmigration zeigen. Allerdings lassen die Migrationsexperimente nicht auf eine durch EDG6 induzierte gerichtete Migration schließen.

Versuche bezüglich der Oberflächenexpression des EDG6-Rezeptors deuten auf eine komplexe zellspezifische Regulation des Oberflächentransports hin. In HEK293-Zellen konnte die Interna-

lisierung des EDG6-Rezeptors nach Stimulierung mit Sphingosin-1-phosphat nachgewiesen werden, während EDG6 in CHO-K1-Zellen erst Minuten nach Sphingosin-1-phosphat-Stimulierung und in HeLa-Zellen Minuten nach Zugabe eines unbekanntes Hitze-instabilen Serumproteins massiv an die Zelloberfläche transportiert wird. Diese Regulation scheint von einem freien EDG6-N-Terminus abhängig zu sein, da N-terminal Epitop-markierte EDG6-Konstrukte nicht mehr dieser differentiellen Oberflächenregulation in HeLa-Zellen unterliegen und konstitutiv an der Zelloberfläche präsent sind.

Um die *in vivo*-Funktion des EDG6-Rezeptors näher untersuchen zu können, wurde ein embryonaler Stammzellklon zur Generierung *edg6*-defizienter Mäuse hergestellt. Möglicherweise moduliert EDG6 nach Bindung von freigesetztem Sphingosin-1-phosphat in autokriner und parakriner Weise die Immunantwort in Folge einer Stimulierung des Immunsystems, die beispielsweise durch eine Infektion induziert werden könnte.



## 7 Summary

The present study demonstrates that the G protein-coupled receptor EDG6 isolated from *in vitro* differentiated human and murine dendritic cells is expressed in hematopoietic and lymphoid tissues and cell lines as well as in lung. The mRNA expression pattern is identical in man and mouse and points to a putative function of the EDG6 receptor in the immune system. The human *edg6* gene is encoded on chromosome 19p13.3, the murine homolog on chromosome 10. Both genes are located upstream of the of the *Gna15/16* gene. The human and murine EDG6 receptors have been detected on the cell surface of transiently transfected cells in the correct orientation. Furthermore, three monoclonal antibodies that are directed against the N-terminus of the murine EDG6 receptor have been generated . They show distinct signals on transiently transfected cell lines, but they lack any specific signal on primary cells so far.

The generation of stably human EDG6 overexpressing cell lines has enabled the investigation of the ligand, the G protein-coupling, and the signal transduction of EDG6. Sphingosine 1-phosphate could be identified as a specific ligand for EDG6 with a moderate binding constant of 63nM. Stimulation of EDG6 leads to the activation of  $G\alpha_i$  and  $G\alpha_{12/13}$  subunits of trimeric G proteins. The mitogen-activated protein-kinases ERK1/2 as well as the phospholipase C are subsequently activated in a  $G\alpha_i$ -dependent manner. Moreover, stimulation of the EDG6 receptor leads to distinct cytoskeleton rearrangements resulting in increasing amounts of peripheral stress fibers, cell rounding and very long filopodia. These effects are induced presumably by  $G\alpha_{12/13}$  and Rho GTPase-driven signaling pathways. A certain pertussis toxin-sensitive and ligand-independent basal activity of the EDG6 receptor is demonstrable in stably human EDG6 overexpressing Jurkat cells that show a higher degree of spontaneous migration events. However, these experiments do not suggest an EDG6-induced migration towards a sphingosine 1-phosphate stimulus.

Experiments concerning the surface expression of EDG6 indicate a complex cell-specific regulation of the surface transportation. In HEK293 cells the internalization of the EDG6 receptor has been shown after stimulation with sphingosine 1-phosphate. In CHO-K1 cells EDG6

is transported towards the cell surface only several minutes after stimulation with sphingosine 1-phosphate, and in HeLa cells the addition of an unknown heat-instable serum protein is critical for the surface transportation of EDG6. The mentioned regulation seems to be dependent on a free EDG6 N-terminus because N-terminal epitope-tagged EDG6 constructs lack the differential surface regulation in HeLa cells. They are constitutively present on the cell surface.

To further investigate the *in vivo* function of the EDG6 receptor, an embryonic stem cell clone has been generated to establish *edg6*-deficient mice. EDG6 possibly modulates the immunological response in an autocrine or paracrine fashion after binding free sphingosine 1-phosphate. This event may happen after an immunological challenge like an infection.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

### Symbole für Aminosäuren

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

### Physikalische Maßeinheiten

A	Ampère	Ci	Curie
d	Tag	F	Farad
g	Gramm	g	Erdbeschleunigung
h	Stunde	l	Liter
m	Meter	M	Mol pro Liter
min	Minute	$\Omega$	Ohm
sek	Sekunde	U	Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute	V	Volt
pfu	<i>Plaque Forming Units</i> , infektiöse Einheiten	OD600	optische Dichte bei 600nm
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280nm	°C	Grad Celsius

### Vorangestellte Größenbezeichnungen

f	femto	p	piko
n	nano	$\mu$	mikro
m	milli	k	kilo

### Symbole für Nukleotide

A	Adenin	G	Guanin	C	Cytosin
T	Thymin	U	Uracil	W	A oder T
R	A oder G	Y	C oder T	M	A oder C
K	G oder T	S	C oder G	D	A oder G oder T
H	A oder C oder T	B	C oder G oder T	V	A oder C oder G
N	A oder G oder C oder T				

**Sonstige Abkürzungen:**

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AChR	Acetylcholinrezeptor
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i> , erworbene Immunschwäche
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	adrenerger Rezeptor
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CB	Cannabinoidrezeptor
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	mRNA-komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosin-5'-monophosphat
CGRP	<i>calcitonin-gene-related protein</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary (cells)</i>
CoA	Koenzym A
Con A	Concanavalin A
CRLR	<i>calcitonin-receptor-like receptor</i>
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DAG	Diacylglycerin
ddNTP	(2',3'-Didesoxynukleosid)-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	(2'-Desoxynukleosid)-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>edg</i>	<i>endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immuno-absorbent assay</i> , enzymatisches Nachweisverfahren
EMFI	embryonale Fibroblastenzellen
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
ES	embryonale Stamm- (Zellen)
<i>et al.</i>	und andere

---

FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i> , Durchflußzytometrie
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FU	Freie Universität
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guaninnukleosid-5'-diphosphat
GEF	<i>guanine-nucleotide exchange factor</i> , Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GnRHR	<i>gonadotropin-releasing hormone receptor</i>
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guaninnukleosid-5'-triphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i> , GPCR-Kinase
GUMC	Georgetown University Medical Center
HA	Hämagglutinin
HEK	<i>human embryonic kidney (cells)</i>
HEPES	(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IGF-1R	<i>insulin-like growth factor receptor</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani
LHR	<i>luteinizing hormone receptor</i> , Hormonrezeptor
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LPA	1-Acyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat, Lysophosphatidylsäure
LPL	Lysophospho- und Lysosphingolipide
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonat
MOR1	$\mu$ -Opioidrezeptor
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NBT/BCIP	Nitroblautetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat

OGR1	<i>ovarian cancer G protein-coupled receptor 1</i>
PA	Phosphatidylsäure
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PE	R-Phycoerythrin
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> , Methode zur Amplifizierung von cDNA-Enden
RAMP	<i>receptor-activity-modifying protein</i> , Rezeptoraktivität-modifizierendes Protein
RBL	<i>rat basophilic leukemia (cells)</i>
RGS	<i>regulator of G protein signaling</i> , G-Protein Regulator
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i> , CXC-Chemokin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylenethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TM	Transmembrandomänen
TRHR	<i>thyrotropin-releasing hormone receptor</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	Ultraviolett
vzg-1	<i>ventricular zone gene-1</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

# 10 Danksagung

**Mein Dank gilt allen, die mir bei der Durchführung meiner Dissertation behilflich waren:**

Meinem Doktorvater Dr. Martin Lipp für die Betreuung dieser Arbeit sowie für die großzügige Unterstützung in allen Belangen.

Prof. Dr. Udo Heinemann für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin sowie für die stete Hilfsbereitschaft, vor allem in Bezug auf das Erstellen von Empfehlungsschreiben.

Dr. Robert Grosse, Dr. Angelika Kusch, Dr. Elisabeth Kremmer, Prof. Dr. Sarah Spiegel und Prof. Dr. Eckhard Wolf für die außerordentlich gelungene und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Thilo Mokros, Dr. Uta Höpken und Dr. Gabor Kaba für die bereitwillige Durchsicht der Korrekturfahnen dieser Dissertation und für die vielen Hinweise, die in diese Arbeit eingeflossen sind.

Daniela Keyner und Dagmar Breinfeld, die in ihrer oft selbstlosen Art und mit ihrer unendlichen Hilfsbereitschaft in erheblichem Maße zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben.

Gerd Müller, Philipp Reiterer und Robert Lange als Weggefährten, die den Laboralltag alles andere als eintönig werden ließen und in vielen Situationen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dr. Ralf Burgstahler, Dr. Anita Mattis und Dr. Veniamin Pevzner, die es vor mir „geschafft“ haben und mir den richtigen Weg wiesen.

Dr. Günter Bernhardt und Dr. Reinhold Förster für die anregenden Diskussionen und vielen Tips, ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

All meinen Kollegen, insbesondere Dr. Felix Cifire, Dr. Christian Ried, Frank Jeblonski, Lars Ohl, Steffen Posner, Peter Graßhoff, Carmen Meese, Oliver Mück, Dagmar Meyer, Andreas Schubel, Richard Schabbat, Michael Schulze, Heiko Johnen, Hagen Kulbe und Thomas Schirrmann für ihre großartige Unterstützung.

Helga Benkert für die bewundernswerte bibliothekarische Betreuung in all den Jahren.

Susi und Andrea als verständnisvolle und liebe Berliner Wegbegleiterinnen sowie Bernd und Wolfgang als kompetente Berater und gute Freunde im Münchener Exil.

Sowieso all meinen Freunden auf diesem Erdball, die mir mit ihrer Anwesenheit und ihren Gesprächen die Zeit versüßt und den Leidensweg verkürzt haben.

Lothar und Paule, die ihre Türen trotz meiner regelmäßigen Besuche nie verschlossen haben.

Und ganz besonders meiner Familie, die immer zu mir gehalten hat.





# Lebenslauf

Name Markus Herbert Gräler  
Geburtsdatum 22. Juli 1971  
Geburtsort Sassenberg  
Eltern Theodor Gräler und Maria Anna Gräler, geborene Eggert

Schulbildung 1978 - 1982 Grundschule Sassenberg  
1982 - 1991 Gymnasium Laurentianum Warendorf  
6/1991 Abitur  
7/1991 - 9/1992 Wehrdienst

Studium 10/1992 - 5/1997 Diplomstudiengang Biochemie an der  
Freien Universität Berlin  
3/1995 Vordiplom  
1/1997 - 5/1997 Diplomarbeit am Max-Delbrück-Centrum Berlin  
unter Anleitung von Dr. Dr. habil. Martin Lipp  
Thema:  
„Identifizierung von Chemokinrezeptoren und  
verwandten Rezeptoren aus dendritischen Zellen“  
5/1997 Diplom  
6/1997 - 9/2000 Doktorarbeit am Max-Delbrück-Centrum Berlin  
unter Anleitung von Dr. Dr. habil. Martin Lipp  
Thema:  
„Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor EDG6“

