

5 Diskussion

5.1 Vergleich des murinen und humanen EDG6 Proteins

Die kodierenden Bereiche der murinen und humanen EDG6-Sequenzen sind auf Nukleotidebene zu 80% und auf Aminosäureebene zu 82% homolog und haben neben einer postulierten Signalsequenz am N-Terminus auch zwei mögliche N-terminale N-Glykosylierungsstellen, fünf mögliche Proteinkinase C (PKC)-Phosphorylierungsstellen in der ersten intrazellulären Schleife und am C-Terminus sowie drei mögliche Palmitoylierungsstellen am C-Terminus gemeinsam (Abb. 4.4). Ob die mit dem Husar-Programm SignalSeq ermittelte N-terminale Signalsequenz eine Bedeutung hat, bleibt offen. Sie könnte beim murinen EDG6-Rezeptor nach der 37. Aminosäure, beim humanen Homolog nach der 36. und mit einer ähnlichen Wahrscheinlichkeit auch nach der 22. Aminosäure enden. Untersuchungen anderer Membranmoleküle haben ergeben, daß in einigen Fällen die Signalsequenz für den Transport zur Zellmembran benötigt wird wie beispielsweise beim Retinal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+},\text{K}^+$ Austauscher der Stäbchenzellen (RodX), bei dem die Signalsequenz nicht abgespalten wird (McKiernan und Friedlander, 1999). Andererseits sind Membranmoleküle wie der cardiale $\text{Na}^+,\text{Ca}^{2+}$ Austauscher bekannt, bei dem die N-terminale Signalsequenz abgespalten und nicht für die funktionelle Membranintegration benötigt wird (Sahin-Toth *et al.*, 1995). Daß die potentielle Signalsequenz von EDG6 abgespalten wird, ist hingegen unwahrscheinlich, da sowohl der humane, als auch der murine N-terminal Hämagglutinin-(HA)-Epitop-markierte EDG6-Rezeptor mit dem spezifischen anti-HA Antikörper 3F10 auf transient transfizierten Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.45, 4.46). Außerdem binden die drei monoklonalen Antikörper 2A1-1-1, 6D7-1 und 8B4-1-1 spezifisch an transient transfizierten murinen EDG6-Rezeptor in der Durchflußzytometrie und in der Western-Blot-Analyse, wobei alle drei Antikörper gegen den N-Terminus gerichtet sind (Abb. 4.22, 4.26, Kap. 4.6.1).

Die beiden potentiellen N-Glykosylierungsstellen am N-Terminus lassen vermuten, daß der EDG6-Rezeptor glykosyliert wird. Obwohl die Hauptbande im Western-Blot etwa dem errechneten Molekulargewicht von 42 kD entspricht, ist eine zweite Bande etwa 3 bis 4kD oberhalb

der Hauptbande zu sehen, die möglicherweise eine posttranslational modifizierte Form des murinen EDG6-Rezeptors darstellt (Abb. 4.26). Glykosylierungen sind bei verschiedenen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren untersucht worden und haben vor allem einen Einfluß auf die Expression und/oder Stabilität sowie die Faltung des entsprechend glykosylierten Rezeptors (Wheatley und Hawtin, 1999). Im Fall des „calcitonin receptor-like receptor“ (CRLR) ist auch beschrieben, daß die Glykosylierung entscheidend ist für die Selektivität des Liganden, wobei eine Kernglykosylierung in Verbindung mit der Koexpression von Rezeptoraktivitäts-modifizierenden Proteinen (RAMPs) 2 und 3 die Bindung von Adrenomedullin ermöglicht, während eine vollständige Glykosylierung mit Koexpression von RAMP1 das „calcitonin gene-related peptide“ (CGRP) binden läßt (Fraser *et al.*, 1999).

Diverse potentielle PKC Phosphorylierungsstellen vor allem am C-Terminus des humanen wie auch des murinen EDG6-Rezeptors deuten auf eine mögliche funktionelle Relevanz dieser Form der posttranslationalen Modifikation hin (Abb. 4.4). Phosphorylierungen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind bislang hauptsächlich mit der homologen oder heterologen Desensitivierung in Verbindung gebracht worden (Kap. 5.9). Neben der Aktivierung spezifischer G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinasen (GRKs), die die Rezeptoren nur im aktivierten Zustand phosphorylieren können, spielen auch „second messenger“ aktivierte Proteinkinasen wie die PKC eine wichtige Rolle bei diesem Prozeß (Krupnick und Benovic, 1998; Tobin, 1997).

Die drei möglichen Palmitoylierungsstellen zwischen dem Ende der siebten Transmembrandomäne und dem intrazellulären C-Terminus dienen vermutlich der Bildung einer vierten intrazellulären Schleife, wie sie bei Rezeptoren der Familie A häufig vorgefunden wird (Abb. 1.1). Vor allem das Cystein 326 des murinen beziehungsweise das Cystein 324 des humanen EDG6-Rezeptors sind interessante Palmitoylierungsstellen, da sie in allen acht bekannten humanen EDG-Rezeptoren konserviert sind (Abb. 4.4). Über die Bedeutung der Palmitoylierung läßt sich nur spekulieren. Während beim β_2 -adrenergen Rezeptor (β_2 AR) die Mutation des Cysteins 341 zu Glycin die Palmitoylierung und damit auch die Kopplung des Gs-Proteins verhinderte, konnten beim α_2A -adrenergen Rezeptor (α_2A AR), beim „luteinizing hormone receptor“ (LHR) und beim Rhodopsin keine funktionellen Konsequenzen nach entsprechenden Mutationen festgestellt werden (O'Dowd *et al.*, 1989; Moffett *et al.*, 1993; Kennedy und Limbird, 1993; Kawate und Menon, 1994; Karnik *et al.*, 1988). Der „thyrotropin-releasing hormone receptor“ (TRHR) und der V2-Vasopressinrezeptor zeigen eine verstärkte Rezeptorinternalisierung nach Mutation der entsprechenden Palmitoylierungsstellen, und der D1-Dopaminrezeptor befindet sich nach einer entsprechenden Mutation in einem konstitutiv desensitivierten Zustand und kann die Adenylatzyklase nicht mehr aktivieren (Nussenzweig *et al.*, 1993; Schülein *et al.*, 1996; Jensen *et al.*,

1995). Daß zumindest in einigen Fällen die Mutation der Palmitoylierungsstelle zu einer erhöhten Phosphorylierung des Rezeptors führt, zeigen Untersuchungen am β_2 AR und am ionotropen Glutamaterezeptor GluR6 (Moffett et al, 1996; Pickering *et al.*, 1995).

5.2 Gewebsspezifische *edg6*-mRNA-Expression

Das Expressionsmuster der *edg6*-mRNA gibt Aufschluß über die Größe der murinen und humanen Transkripte sowie über deren Zell- und Gewebsspezifität. Aus den Northern-Blots mit humanen Zelllinien und murinen Geweben geht deutlich hervor, daß weder im humanen System mit einem 1,7kb großen Transkript, noch im murinen System mit einem 2,1kb großen Transkript andere Spleißvarianten existieren, die mit dieser Methode nachweisbar sind (Abb. 4.11, 4.13). Dies ist auch bei den meisten anderen EDG-Rezeptoren nicht der Fall, mit Ausnahme von EDG4 und EDG8, die jeweils zwei Transkripte im Northern-Blot zeigen mit Größen von 1,8kb und 8kb beim humanen EDG4 sowie 2,2kb und 2,8kb bei EDG8 aus der Ratte (An *et al.*, 1998a; Glickman *et al.*, 1999). Während die beiden verschiedenen Transkripte bei EDG4 zell- und gewebsspezifisch unterschiedlich exprimiert werden, scheint eine derartige differentielle Expression bei EDG8 nicht vorzuliegen (An *et al.*, 1998a; Im *et al.*, 2000).

Bezüglich der Zell- und Gewebsspezifität der *edg6*-mRNA-Expression ist eine hohe Spezifität für das lymphatische und hämatopoietische System festzustellen, die im Menschen und in der Maus identisch ist (Abb. 4.11, 4.12, 4.13). Einzig die Expression in der Lunge paßt augenscheinlich nicht in dieses Schema, wobei allerdings zu bedenken ist, daß Makrophagen sehr fest an das Lungengewebe adhäreren und möglicherweise für das dort detektierte Signal verantwortlich sind. Dies würde auch in Übereinstimmung mit der gefundenen Expression in der promyelozytischen Zelllinie U937 stehen, die die Charakteristika einer myeloiden Vorläuferzelle besitzt, aus der unter anderem auch Makrophagen hervorgehen können (Abb. 4.11).

Auf der zellulären Ebene konnte die Expression von *edg6*-mRNA in verschiedenen humanen B- und T-Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 4.11). Allerdings scheint die zelluläre Expression nicht auf Leukozyten beschränkt zu sein, da mit Hilfe von PCR-Analysen das *edg6*-Transkript auch in Thrombozyten nachgewiesen werden konnte (Motohashi *et al.*, 2000). Dennoch kann aufgrund der gezeigten Expression des EDG6-Rezeptors auf mRNA-Ebene davon ausgegangen werden, daß seine Funktion vor allem im lymphatischen System eine Rolle spielen dürfte. Damit hebt sich EDG6 deutlich von den anderen EDG-Rezeptoren ab, die sich aufgrund ihrer häufig sehr weitreichenden Expression nicht in gleicher Weise einem funktionellen System zuordnen lassen (Tab. 1.4).

5.3 Lokalisation des *edg6*-Gens

Vergleichende Datenbankanalysen sowie die Sequenzierung muriner flankierender genomischer *edg6*-Regionen haben ergeben, daß *edg6* auf dem humanen Chromosom 19p13.3 unmittelbar vor dem repetitiven Dinukleotid-Polymorphismus D19S120 sowie auf dem murinen Chromosom 10 kodiert ist (Kap. 4.4). Die direkte Nachbarschaft zur Satellitensequenz D19S120 ist insofern beachtenswert, da diverse Studien eine erhöhte Instabilität ähnlicher Satellitensequenzen in Verbindung mit verschiedenen Krankheitsbildern festgestellt haben (Risinger *et al.*, 1993; Pykett *et al.*, 1994). Obwohl der repetitive Dinukleotid-Polymorphismus D19S120 bislang nicht mit einem Krankheitsbild in Zusammenhang gebracht werden konnte, bleibt es zukünftigen Untersuchungen vorbehalten zu klären, ob ähnliche Instabilitäten auch bei dieser Satellitensequenz auftreten und möglicherweise mit der funktionellen Expression des unmittelbar benachbarten *edg6*-Gens korrelieren.

Eine markante Feststellung hinsichtlich der genomischen Lokalisation des humanen wie auch des murinen Gens ist weiterhin die Nachbarschaft zum *Gna15/16*-Gen, das die $G\alpha_{15/16}$ -Untereinheit kodiert. Die humane $G\alpha_{16}$ -Untereinheit ist das Homolog zur murinen $G\alpha_{15}$ -Untereinheit und wird in der Literatur als eine $G\alpha$ -Untereinheit beschrieben, die spezifisch in hämatopoietischen Zellen exprimiert wird (Amatruda *et al.*, 1991). Der Vergleich des Expressionsmusters der humanen $G\alpha_{16}$ -Untereinheit mit dem des humanen EDG6-Rezeptors auf mRNA-Ebene zeigt jedoch, daß $G\alpha_{16}$ auch in lymphatischen Geweben exprimiert wird (Abb. 4.30B). Das Expressionsmuster der $G\alpha_{16}$ -mRNA ist jedoch sowohl in Hinblick auf die Gewebsspezifität, als auch in Hinblick auf die jeweiligen Expressionsintensitäten deutlich unterschiedlich als das der *edg6*-mRNA, so daß beide Gene trotz ihrer unmittelbaren Nachbarschaft unterschiedlich reguliert werden (Abb. 4.30). Der direkte Nachweis der G-Protein-Kopplung hat außerdem gezeigt, daß $G\alpha_{16}$ in stabil mit humanem C-terminal *myc*-Epitop-markiertem EDG6-Rezeptor transfizierten CHO-K1-Zellen nach Sphingosin-1-phosphat-(S1P)-Stimulierung nicht aktiviert wird (Abb. 4.31). Somit ist auch ein direkter funktioneller Zusammenhang beider benachbarter Gene in Hinblick auf eine direkte Kopplung unwahrscheinlich. Allerdings bleibt die Frage einer möglichen direkten oder indirekten Wechselwirkung zum Beispiel in Form eines „Cross-Talks“ bei der intrazellulären Signalweiterleitung in endogen EDG6-exprimierenden Zellsystemen bestehen, da die Expression der $G\alpha_{16}$ -Untereinheit beispielsweise in T-Zellen abhängig vom Differenzierungsstadium sehr weitreichend reguliert wird und funktionelle Wechselwirkungen in dem verwendeten CHO-K1-Zellsystem aufgrund der spezifischen Expressionskontrolle der $G\alpha_{16}$ -Untereinheit in diesem Fall nur sehr bedingt übertragen werden können (Lippert *et al.*, 1997, Kap. 5.5).

Von den restlichen bekannten EDG-Rezeptoren ist lediglich EDG4 auch auf Chromosom 19 lokalisiert (Contos und Chun, 2000). Interessanterweise wird das größere der beiden gefundenen *edg4*-mRNA-Transkripte in Milz, Thymus und Leukozyten exprimiert und ist somit ebenfalls spezifisch in lymphatischen Geweben vorhanden, während das kleinere Transkript auch in anderen Geweben gefunden wird (An *et al.*, 1998a).

5.4 Sphingosin-1-phosphat ist ein Ligand von EDG6

Radioaktive Bindungsassays haben gezeigt, daß Sphingosin-1-phosphat (S1P) spezifisch mit einer Bindungskonstante von 63nM an EDG6 bindet (Abb. 4.29). Andere Untersuchungen haben eine Bindungskonstante von 10 bis 20nM ergeben (Yamazaki *et al.*, 2000). Im Vergleich zu den Bindungskonstanten der restlichen S1P-bindenden EDG-Rezeptoren EDG1 (8nM), EDG3 (23nM), EDG5 (27nM) und EDG8 (2nM) bedeutet der ermittelte Wert eine moderate Affinität von S1P zum EDG6-Rezeptor (Lee *et al.*, 1998b; Van Brocklyn *et al.*, 1998; Van Brocklyn *et al.*, 1999; Im *et al.*, 2000). Die Spezifität hingegen ist hoch, da lediglich Dihydro-S1P mit einer im Vergleich zu S1P etwa 5-fach reduzierten Bindungskonstante von 210nM um die S1P-Bindung an EDG6 konkurrieren kann (Abb. 4.29). Die anderen S1P-bindenden EDG-Rezeptoren binden Dihydro-S1P mit einer vergleichbaren Affinität wie S1P (Van Brocklyn *et al.*, 1998a,b; Im *et al.*, 2000). Ob die deutlich geringere Affinität des EDG6-Rezeptors zu Dihydro-S1P im Vergleich zu S1P eine physiologische Relevanz hat, ist bislang nicht bekannt.

Die etwa 100-fach geringere Affinität des EDG6-Rezeptors zu Sphingosylphosphorylcholin (SPC), das mit einer Bindungskonstante von 4,6 μ M an EDG6 bindet, findet man auch bei den anderen S1P-bindenden EDG-Rezeptoren. Humane Erythroleukämie-(HEL)-Zellen, die EDG1 oder EDG3 exprimieren sowie EDG5 exprimierende humane Erythroleukämie K562-Zellen zeigen ein Calciumsignal nach SPC-Stimulierung mit einer etwa 100-fach geringeren Wirksamkeit im Vergleich zur S1P-Stimulierung, und eine entsprechend geringere Bindungsaffinität wird auch bei EDG8 beschrieben (Okamoto *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 1999; Gonda *et al.*, 1999; Im *et al.*, 2000). Somit scheint SPC ein Agonist mit geringer Affinität für alle bislang bekannten S1P-bindenden EDG-Rezeptoren zu sein. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, daß die beschriebenen Effekte nicht primär durch SPC hervorgerufen wurden, da in kommerziell erhältlichen SPC-Präparationen Kontaminationen mit Alkenylglycero-3-phosphat nachgewiesen wurden (Lilom *et al.*, 1998). Zudem ist mit dem „ovarian cancer G protein-coupled receptor 1“ (OGR1), auch bekannt unter der Bezeichnung GPR68, ein Rezeptor identifiziert worden, der spezifisch Sphingosylphosphorylcholin (SPC) mit einer Bindungskonstante von 33nM als Ligand bindet

(Xu *et al.*, 2000).

Aufgrund der moderaten Bindungsaffinität von S1P zum EDG6-Rezeptor stellt sich die Frage, ob es noch einen weiteren endogenen Liganden gibt, der möglicherweise mit einer höheren Affinität an EDG6 bindet. Unterstützt wird diese Hypothese durch einen phylogenetischen Vergleich der EDG-Rezeptoren untereinander, bei dem EDG6 zwar die höchste Identität zu den S1P-bindenden EDG-Rezeptoren hat, allerdings auf einem eigenen Ast zwischen den Lyso-phosphatidylsäure-(LPA)-bindenden und den S1P-bindenden EDG-Rezeptoren dargestellt wird (Abb. 1.3). Die Identifizierung neuer, S1P und LPA-verwandter Lipidderivate, die ebenfalls als Signalmoleküle fungieren können, lassen die Möglichkeit eines EDG6-Liganden mit höherer Bindungsaffinität als S1P offen (Kap. 1.3).

5.5 EDG6 koppelt an G-alpha-i und G-alpha-12/13

Versuche zur spezifischen G α -Kopplung an EDG6 mit dem photoreaktiven GTP-Analog [$\alpha^{32}\text{P}$]GTP-Azidoanilid haben gezeigt, daß EDG6 spezifisch an G α i und G α 12/13 koppelt (Abb. 4.31). Die aufgrund der bereits diskutierten genomischen Nachbarschaft vermutete Kopplung der G α 16 Untereinheit hat sich nicht bewahrheitet (Abb. 4.30, 4.31). Dieses Ergebnis ist insofern instruktiv, da bislang davon ausgegangen worden ist, daß G α 12/13 durch Rezeptoren aktiviert wird, die ebenfalls an G α q und/oder G α 11 koppeln (Offermanns *et al.*, 1994; Laugwitz *et al.*, 1996; Gohla *et al.*, 1998; Gohla *et al.*, 1999). Eine Aktivierung der G α q-Untereinheit konnte nach Stimulierung des EDG6-Rezeptors jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 4.31).

Mitglieder der Gruppe der G α i-Untereinheiten sind unter anderem in der Lage, die Adenylatzyklase I und V zu inhibieren und die Phosphoinositol-3-kinase zu aktivieren (Tab. 1.2). Ferner können über die $\beta\gamma$ -Untereinheiten die Phospholipasen C und A₂ aktiviert werden (Tab. 1.2). Untersuchungen in B-Zellen haben ebenfalls eine G α i-abhängige Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK) nachgewiesen (Wan *et al.*, 1996). Bis auf G α z sind alle Mitglieder der G α i Unterfamilie Pertussistoxin-sensitiv (Tab. 1.1).

Die G α 12/13-Untereinheiten bilden die jüngste Unterfamilie trimärer G-Proteine (Knall und Johnson, 1998). Die erste Funktion, die diesen G α -Untereinheiten zugeschrieben wurde, war die Regulation eines Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE, Dhanasekaran *et al.*, 1994). Obwohl inzwischen gezeigt werden konnte, daß alle drei bekannten NHE über G α 12/13 reguliert werden, sind die direkten Effektoren dieser Regulation bislang noch unbekannt (Lin *et al.*, 1996). Eine weitere Funktion der G α 12/13-Untereinheiten ist die Regulation des Zytoskeletts (Buhl *et al.*, 1995; Gohla *et al.*, 1998). Erstmals konnte in diesem Zusammenhang mit dem Rho-Aktivatoren p115RhoGEF

ein direkter Effektor von $G\alpha_{12/13}$ identifiziert werden, wodurch der erste vollständige $G\alpha_{12/13}$ -abhängige intrazelluläre Signalweg beschrieben wurde (Hart *et al.*, 1998).

5.6 EDG6 aktiviert die MAP-Kinase und die Phospholipase C

Aufgrund der Ergebnisse der G-Protein-Kopplung wurden intrazelluläre Signalwege untersucht, die $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12/13}$ -abhängig sind. Zu den bereits angesprochenen möglichen $G\alpha_i$ -abhängigen Signaltransduktionswegen gehört zum einen die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), zum anderen die Stimulierung der zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) zählenden extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERKs). Beide Signalwege werden in CHO-K1-Zellen über EDG6 angesprochen und sind Pertussistoxin-sensitiv und damit abhängig von $G\alpha_i$ (Abb. 4.32, 4.34).

Über die Bedeutung dieser Signalwege in Verbindung mit der Stimulierung des EDG6-Rezeptors kann zur Zeit nur spekuliert werden. Die MAPK ERK1/2 sind entscheidend für die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung, p38 und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) spielen eine Rolle bei Entzündungsprozessen, Apoptose und Entwicklung (Übersicht in Schaeffer und Weber, 1999). Zellproliferation und Differenzierungsprozesse verschiedener Zellen konnten auch durch Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Lysophosphatidylsäure (LPA) induziert werden (Tab. 1.5). Ferner ist eine Pertussistoxin-sensitive und damit $G\alpha_i$ -abhängige MAPK-Aktivierung bei den S1P-bindenden Rezeptoren EDG1, EDG3 und EDG5 sowie beim LPA-bindenden Rezeptor EDG4 gezeigt worden (Lee *et al.*, 1996; Okamoto *et al.*, 1999; Gonda *et al.*, 1999; Bandoh *et al.*, 1999). Somit liegt die Vermutung nahe, daß S1P und LPA über eine $G\alpha_i$ -abhängige Rezeptor-vermittelte Aktivierung der spezifischen MAPK ERK1/2 das Wachstum und die Differenzierung bestimmter Zellen regulieren. EDG5 aktiviert zudem die MAPK p38 und JNK, so daß auch über eine mögliche Aktivierung weiterer MAPK durch EDG6 spekuliert werden kann.

Die Aktivierung der PLC führt zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Sie ist auch bei anderen EDG-Rezeptoren wie EDG1, EDG3 und EDG5 nachgewiesen worden (Okamoto *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 1999). IP₃ öffnet Calciumkanäle und bewirkt so die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Calciumspeichern, wodurch zahlreiche zelluläre Effekte ausgelöst werden können (Überblick in Clapham, 1995). Daß trotz der nachgewiesenen PLC-Aktivierung kein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in stabil mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem humanem EDG6-Rezeptor transfizierten CHO-K1 und Jurkat-Zellen nachgewiesen werden konnte, wird in einem anderen Zusammenhang in Kap. 5.10 diskutiert. DAG wiederum aktiviert die

Proteinkinase C (PKC), die ebenfalls zahlreiche zelluläre Effekte induzieren kann (Überblick in Kanashiro und Khalil, 1998). Desweiteren wurden sowohl homologe, wie auch heterologe PKC-Phosphorylierungen diverser G-Protein-gekoppelter Rezeptoren beschrieben, die vor allem eine Rolle bei der Rezeptordesensitivierung spielen (Tobin, 1997). Somit scheint die EDG6-abhängige und G_i-gekoppelte Aktivierung der PLC zu IP₃ und DAG-vermittelten zellulären Effekten zu führen, deren genaue Untersuchung noch aussteht. Desweiteren ist die DAG-vermittelte Aktivierung der PKC möglicherweise auch an der Phosphorylierung des Rezeptors im Zuge der Rezeptordesensitivierung beteiligt, die in Kap. 5.9 diskutiert wird.

5.7 Zytoskelettveränderungen in CHO-K1-Zellen

Es konnte gezeigt werden, daß EDG6 in CHO-K1-Zellen nach Stimulierung mit Sphingosin-1-phosphat (S1P) eine deutliche Zunahme an peripheren Streßfasern, abgerundeten Zellen und besonders langen Filopodien induziert (Abb. 4.35). Veränderungen des Zytoskeletts werden vor allem über G α 12/13-gekoppelte Signalwege gesteuert, die wiederum kleine G-Proteine der Rho-Familie aktivieren (Kjøller und Hall, 1999; Gohla *et al.*, 1999; Klages *et al.*, 1999). Cdc42, ebenfalls ein Mitglied der Familie der Rho-GTPasen, scheint vor allem bei der Bildung von Filopodien involviert zu sein, während Rho bei der Generierung von Stressfasern eine Rolle spielt (Kozma *et al.*, 1995; Gohla *et al.*, 1999; Klages *et al.*, 1999). Vergleichende Analysen mit Wildtyp-RhoA gegenüber einer dominant negativen N19-RhoA-Mutante, die in den CHO-K1-Zellen transient kotransfiziert wurden, haben gezeigt, daß die beschriebenen Zytoskelettveränderungen, die durch EDG6 nach S1P-Stimulierung induziert werden, bei den dominant negativen N19-RhoA kotransfizierten Zellen deutlich geringer waren als in den Wildtyp-RhoA kotransfizierten Zellen (Abb. 4.36). Obwohl diese Beobachtungen rein phänotypischer Natur sind, deuten sie dennoch klar auf eine Beteiligung von RhoA an den beobachteten Zytoskelettveränderungen hin. Das Ergebnis wird gestützt durch Untersuchungen mit EDG5 überexprimierenden CHO-Zellen, in denen nach Stimulierung mit S1P eine durch EDG5 induzierte deutliche Zunahme an Stressfasern beobachtet wurde (Gonda *et al.*, 1999). Der Effekt ist sensitiv für die C3-Transferase, ein Enzym aus *Clostridium botulinum*, das spezifisch ADP ribosyliert und RhoA, RhoB und RhoC inhibiert (Aktories *et al.*, 1989). Außerdem konnte in EDG5-überexprimierenden differenzierten Pheochromozytom PC12-Rattenzellen eine deutliche Zunahme an abgerundeten Zellen festgestellt werden (Van Brocklyn *et al.*, 1999). Interessanterweise ist dieser Effekt auch ohne S1P-Stimulierung zu beobachten, was auf eine konstitutive Basalaktivität des EDG5-Rezeptors zurückzuführen sein könnte. Eine ähnliche intrinsische Basalaktivität konnte auch für EDG2 im

Baculovirus-Expressionssystem nachgewiesen werden (Yoshida und Ueda, 1999). Tatsächlich haben die unstimulierten EDG6 überexprimierenden CHO-K1-Zellen bezüglich der untersuchten Zytoskelettveränderungen einen Phänotyp, der etwa dem von S1P-stimulierten nicht transfizierten CHO-K1-Zellen entspricht, weshalb ebenfalls über eine gewisse Liganden-unabhängige Basalaktivität des EDG6-Rezeptors spekuliert werden kann, was im folgenden Abschnitt unter einem anderen Gesichtspunkt noch näher erläutert wird (Abb. 4.35).

5.8 Pertussistoxin-sensitive Spontanmigration von Jurkat-Zellen

Die Migrationsexperimente haben gezeigt, daß Jurkat-Zellen endogen in der Lage sind, auf einen Sphingosin-1-phosphat-(S1P)-Stimulus hin zu migrieren (Abb. 4.38). Da alle EDG-Rezeptoren von EDG1 bis EDG7 in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden konnten und von EDG1 und EDG3 gezeigt wurde, daß sie Zellen zur Migration hin zu einem S1P-Stimulus anregen können, induzieren vermutlich EDG1 und EDG3 die beobachtete endogene Migration der Jurkat-Zellen (Motohashi *et al.*, 2000; Kon *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2000). Das Migrationsoptimum von 1 bis 10nM von nicht transfizierten und Vektor-transfizierten Jurkat-Zellen stimmt mit den publizierten Daten bezüglich EDG1 und EDG3-induzierter Migrationsereignisse überein (Kon *et al.*, 1999). Die Verschiebung des Migrationsoptimums hin zur höheren S1P-Konzentration von 100nM bei stark EDG6 überexprimierenden Jurkat-Zellen ist vermutlich dadurch zu erklären, daß die große Zahl an exprimierten EDG6-Rezeptoren entsprechend viel S1P bindet und somit die Menge an freiem S1P deutlich reduziert wird, so daß für den gleichen durch EDG1 und EDG3 verursachten Migrationseffekt eine entsprechend höhere S1P-Konzentration benötigt wird (Abb. 4.38). Diese mögliche Erklärung impliziert, daß EDG6 von sich aus keine Zellmigration induzieren kann. Gestützt wird diese Hypothese durch das Migrationsverhalten des schwach EDG6 exprimierenden Jurkat-Klons (Abb. 4.38). Dieser Klon zeigt keine Verschiebung des Migrationsoptimums hin zu höheren S1P-Konzentrationen, obwohl er nachweislich EDG6 überexprimiert (Abb. 4.37). Somit scheint die beobachtete Verschiebung des Migrationsoptimums bei stark EDG6 überexprimierenden Jurkat-Zellen hin zu einer höheren S1P-Konzentration kein spezifischer Effekt von EDG6 zu sein, sondern lediglich ein unspezifischer Nebeneffekt aufgrund einer höheren Konkurrenz um die S1P-Bindung, die durch die hohe Zahl zusätzlich exprimierter EDG6-Rezeptoren hervorgerufen wird. Ein endgültiger Beweis dieser Hypothese mit Zellen, die keine S1P-bindenden EDG-Rezeptoren, insbesondere nicht EDG1 und EDG3 exprimieren, steht noch aus.

Eine aufschlußreiche Beobachtung ist, daß EDG6 überexprimierende Jurkat-Zellen ge-

genüber Vektor-transfizierten Kontrollzellen eine deutlich erhöhte Spontanmigration zeigen, die Pertussistoxin-sensitiv ist (Abb. 4.39). Die Sensitivität gegenüber Pertussistoxin zeigt, daß dieser Effekt spezifisch über die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der $G_{\alpha i}$ -Untereinheit trimärer G-Proteine verläuft. S1P hingegen hat nur einen geringen Einfluß auf die erhöhte Spontanmigration (Abb. 4.39). Somit scheint EDG6-unabhängig von der Stimulierung über einen Liganden Jurkat-Zellen zu einer erhöhten $G_{\alpha i}$ -abhängigen Spontanmigration anzuregen. Obwohl dieser Effekt bislang noch nicht beschrieben wurde, haben Untersuchungen im Baculovirus-Expressionssystem gezeigt, daß der Lysophosphatidylsäure-(LPA)-bindende Rezeptor EDG2 in der Lage ist, G_{i1} ohne Stimulierung über einen Liganden zu aktivieren (Yoshida und Ueda, 1999). Versuche mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) stützen die Beobachtung, daß GPCRs eine gewisse basale Aktivität besitzen und daher G-Proteine auch in Abwesenheit von Agonisten aktivieren können (Costa und Herz, 1989; Samama *et al.*, 1994; Chidiac *et al.*, 1994). Diese Untersuchungen untermauern die Hypothese, daß möglicherweise allein die Expression von EDG6 ausreicht, um über eine konstitutive Aktivierung von $G_{\alpha i}$ die Spontanmigration von Jurkat-Zellen zu erhöhen. Jurkat-Zellen exprimieren zwar auch endogen EDG6, das entsprechende Signal in der PCR-Analyse ist aber im Vergleich zur Expression der anderen untersuchten EDG-Rezeptoren sehr schwach, was auf eine sehr geringe Expressionsrate hindeuten könnte, wodurch der gezeigte Effekt in Jurkat-Kontrollzellen vermutlich nicht zu beobachten ist und erst in EDG6 überexprimierenden Zellen deutlich wird (Motohashi *et al.*, 2000). Daß das C-terminal angehängte *myc*-Epitop bei diesem Effekt eine Rolle spielt, ist hingegen unwahrscheinlich, da es in allen anderen durchgeführten funktionellen Untersuchungen keine offensichtlichen Beeinträchtigungen gab. Ferner konnte bereits bei den Untersuchungen der Zytoskelettveränderungen eine gewisse Liganden-unabhängige Basalaktivität des EDG6-Rezeptors festgestellt werden, die bereits diskutiert wurde (Abb. 4.35, Kap. 5.7). Ein möglicher Einfluß von EDG6 auf S1P-unabhängige Migrationsereignisse wie die vom Chemokinrezeptor CXCR4 induzierte Migration hin zum SDF-1-Stimulus hat sich nicht bestätigt (Abb. 4.41).

5.9 Rezeptorinternalisierung von EDG6 auf HEK293-Zellen

Es konnte gezeigt werden, daß EDG6 durch einen Pertussistoxin-insensitiven Mechanismus nach Sphingosin-1-phosphat-(S1P)-Stimulierung innerhalb von Minuten von der Oberfläche von HEK293-Zellen internalisiert wird. Dieser Internalisierungsprozeß ist S1P-spezifisch und kann nicht durch Lysophosphatidylsäure (LPA) ausgelöst werden (Abb. 4.42). Rezeptorinternalisierungen sind bei zahlreichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nachgewiesen worden und spie-

len vermutlich eine bedeutende Rolle bei dem Prozeß der Rezeptordesensitivierung (Shapiro *et al.*, 1996; Förster *et al.*, 1998; Ferguson und Caron, 1998). Phosphorylierungen, die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) sowie „second messenger“ aktivierte Kinasen wie die Proteinkinase A (PKA) oder die Proteinkinase C (PKC) katalysiert werden, induzieren die Desensitivierung der Rezeptoren (Pitcher *et al.*, 1998). Dabei unterscheidet man zwischen der homologen Desensitivierung, bei der nur die aktivierten Rezeptoren desensitiviert werden, und der heterologen Desensitivierung, bei der nicht die aktivierten, sondern andere heterologe GPCRs desensitiviert werden (Bünemann und Hosey, 1999). In beiden Fällen werden die GPCRs innerhalb von Millisekunden bis zu wenigen Minuten an intrazellulären Ser/Thr-Resten phosphoryliert. Nach Phosphorylierung des Rezeptors bildet sich ein GPCR-Arrestin-Komplex, der nicht mehr mit G-Proteinen interagieren kann und in Endosomen internalisiert wird (Palczewski, 1997). Die Rezeptorinternalisierung selbst spielt wahrscheinlich eher eine Rolle bei der anschließenden Resensitivierung, bei der die Rezeptoren nach Endozytose dephosphoryliert und wieder an die Zelloberfläche transportiert werden (Pitcher *et al.*, 1998; Ferguson und Caron, 1998). Die neu hergestellten monoklonalen Antikörper gegen den murinen EDG6-Rezeptor können keine Rezeptorinternalisierung induzieren und sind daher vermutlich nicht in der Lage, um die S1P-Bindungsstelle zu konkurrieren und den murinen EDG6-Rezeptor zu aktivieren (Kap. 4.12.1). Da die Antikörper gegen den N-Terminus des murinen EDG6-Rezeptors gerichtet sind, kann spekuliert werden, daß der N-Terminus bei der Ligandenbindung keine große Rolle spielt. Unterstützt wird diese Hypothese durch funktionelle Untersuchungen am humanen EDG6-Rezeptor, bei dem ein N-terminal angehängtes FLAG-Epitop keine Auswirkungen auf die Effizienz der S1P-abhängigen Rezeptoraktivierung hatte (Yamazaki *et al.*, 2000). Somit bindet S1P vermutlich tief in der von den Transmembrandomänen gebildeten Bindungstasche, was auch bei anderen kleinen Liganden wie Rhodopsin, Eicosanoiden, Purinen und biogenen Aminen gezeigt werden konnte (Sakmar, 1998; Ji *et al.*, 1998; Mansour *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993; Gantz *et al.*, 1992). Neben EDG6 konnte auch bei EDG1 nach S1P-Stimulierung eine Rezeptorinternalisierung beobachtet werden (Lee *et al.*, 1998b; Liu *et al.*, 1999). Die Deletion des C-Terminus von EDG1 inhibierte vollständig den Internalisierungsprozeß, was die bereits diskutierte potentielle Bedeutung von C-terminalen Phosphorylierungsstellen bei diesem Vorgang unterstreicht (Liu *et al.*, 1999).

5.10 Stimulierungsabhängige Oberflächenexpression auf CHO-K1-Zellen

Die *myc*-Epitop Färbung in stabil mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem humanem EDG6-Rezeptor transfizierten permeabilisierten CHO-K1-Zellen zeigt, daß in diesem Zellsystem offensichtlich der EDG6-Rezeptor erst Minuten nach Sphingosin-1-phosphat-(S1P)-Stimulierung massiv auf die Oberfläche transportiert wird, während er in unstimulierten CHO-K1-Zellen vorzugsweise im perinukleären Raum vorzufinden ist (Abb. 4.43). Somit scheint der EDG6-Rezeptor in CHO-K1-Zellen nicht von vornherein vollständig an die Oberfläche transportiert zu werden (Abb. 4.43). Im Gegensatz dazu präsentieren HEK293-Zellen, bei denen die zuvor diskutierte Rezeptorinternalisierung zu beobachten ist, den murinen C-terminal *myc*-Epitop-markierten sowie den humanen N-terminal Hämagglutinin-(HA)-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor massiv auf der Zelloberfläche (Abb. 4.17, 4.22). Obwohl eine derartige zellspezifisch differentiell regulierte Oberflächenexpression bislang noch bei keinem anderen EDG-Rezeptor gezeigt werden konnte, sind Untersuchungen anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bekannt, bei denen ähnliche Beobachtungen gemacht wurden. So wird der GABA_BR1-Rezeptor beispielsweise als kernglykosyliertes Protein intrazellulär zurückgehalten und erst dann als vollständig glykosylierter funktioneller Rezeptor an der Zelloberfläche präsentiert, wenn er mit dem GABA_BR2-Rezeptor koexprimiert wird (White *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998; Kuner *et al.*, 1999). Desweiteren sind die Rezeptoraktivität-modifizierenden Proteine (RAMPs) bekannt, die einen Einfluß auf den Oberflächentransport und auf die Substratspezifität des CRLR (calcitonin-receptor-like receptor) haben (Foord und Marshall, 1999). CRLR wird nur bei Koexpression mit einem der drei bekannten RAMPs an die Oberfläche transportiert. Bei Koexpression mit RAMP1 wird ein vollständiges Glykoprotein als CGRP-(Calcitonin-gene-related peptide)-Rezeptor an der Zelloberfläche präsentiert, bei Koexpression mit RAMP2 oder RAMP3 ist CRLR kernglykosyliert und wird als Adrenomedullinrezeptor präsentiert (McLatchie *et al.*, 1998). Die weit verbreitete Expression der RAMPs läßt auf weitere, bislang unbekannte Interaktionspartner schließen (Foord und Marshall, 1999). Zudem wurde bei der Expression des „thyrotropin-releasing hormone receptor“ (TRHR) beobachtet, daß die Expression abhängig vom jeweiligen Zellsystem entweder im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat oder aber an der Zelloberfläche erfolgt (Yu und Hinkle, 1997). Eine differentiell unterschiedliche endogene Expression in verschiedenen Neuronen-Populationen ist auch für den μ -Opioidrezeptor (MOR1) beschrieben worden (Arvidsson *et al.*, 1995).

Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß die stabil transfizierten CHO-K1-Zellen den EDG6-

Rezeptor erst nach S1P-Stimulierung an die Zelloberfläche transportieren. Offensichtlich wird durch S1P ein Signal in der Zelle induziert, das den Oberflächentransport von EDG6 einleitet (Abb. 4.43). Ob dieses Signal Rezeptor-vermittelt über einen der wenigen auf der Oberfläche befindlichen EDG6-Rezeptoren oder über einen anderen S1P-bindenden Rezeptor in das Zellinnere weitergeleitet wird, oder ob S1P direkt in die Zelle eindringen kann und als „second messenger“ intrazellulär das Signal auslöst, ist nicht bekannt. Untersuchungen haben gezeigt, daß S1P möglicherweise auch als intrazellulärer „second messenger“ fungieren kann, obwohl bislang noch keine intrazellulären Moleküle identifiziert werden konnten, die mit S1P interagieren (Van Brocklyn *et al.*, 1998; Spiegel, 1999; Hla *et al.*, 1999). Ebenso wenig konnte bislang eine Interaktion unterschiedlicher EDG-Rezeptoren beispielsweise durch Überschneidungen in der Signaltransduktion („Cross-Talk“) oder durch Rezeptordimerisierung nachgewiesen werden.

Die beobachtete differentielle Oberflächenexpression von EDG6 auf CHO-K1-Zellen hat vermutlich auch einen Einfluß auf funktionelle Untersuchungen in diesem und möglicherweise auch anderen Zellsystemen. So konnte beispielsweise mit den stabil C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor überexprimierenden CHO-K1 und Jurkat-Zellen kein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulierung mit S1P festgestellt werden, obwohl andere Untersuchungen in CHO-Zellen mit einem entsprechenden N-terminal FLAG-Epitop markierten Rezeptorkonstrukt ein deutliches Calciumsignal zeigten (Abb. 4.33, Yamazaki *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu anderen Methoden wie den Migrationsexperimenten (Kap. 3.22), dem Luziferase-Assay (Kap. 3.23) oder der intrazellulären Inositolphosphat-Messung (Grosse *et al.*, 2000) inkubieren die Zellen beim Calcium-Assay nach S1P-Stimulierung nicht noch weitere 30min bis mehrere Stunden, in denen sich der beschriebene Transport des EDG6-Rezeptors an die Zelloberfläche einstellen kann, sondern werden direkt nach der Stimulierung auf Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration hin untersucht (Kap. 3.24). Daher ist es möglich, daß aufgrund der geringen EDG6-Rezeptordichte auf der Oberfläche der Zellen keine Weiterleitung des Signals zu den Calciumkanälen erfolgte, da nicht genügend Rezeptoren aktiviert werden konnten. Dem gegenüber könnte das N-terminal FLAG-Epitop-markierte EDG6-Rezeptorkonstrukt möglicherweise nicht dem differentiellen Oberflächentransport unterliegen, sondern konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Hinweise dafür zeigen Experimente mit murinem und humanem N-terminal HA-Epitop-markiertem EDG6-Rezeptor, die eine in transient transfizierten HeLa-Zellen beobachtete Regulation der Oberflächenexpression offenbar umgehen und ebenfalls konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Abb. 4.45, 4.46). Dieser Mechanismus wird im Anschluß noch eingehender diskutiert. In diesem Fall würde die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche ausreichen, um genügend EDG6-Rezeptoren für die Öffnung intrazellulärer Cal-

ciumspeicher zu aktivieren. Daß EDG6 in der Lage sein sollte, nach Aktivierung intrazelluläre Calciumspeicher zu öffnen, zeigt die nachgewiesene Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) spaltet, wobei IP₃ direkt Calciumkanäle öffnen kann (Abb. 4.34).

5.11 Differentieller Oberflächentransport in HeLa-Zellen

Analysen bezüglich der Oberflächenexpression des murinen EDG6-Rezeptors auf transient transfizierten HeLa-Zellen haben ergeben, daß der Transport von EDG6 zur Zelloberfläche durch ein Hitze-instabiles Serumprotein innerhalb von Minuten induziert wird (Abb. 4.44, Kap. 4.12.3). Diese Beobachtung steht im Widerspruch mit den bereits diskutierten Ergebnissen in stabil mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem humanem EDG6-Rezeptor transfizierten CHO-K1-Zellen, in denen ein Transport von EDG6 an die Zelloberfläche innerhalb von Minuten nach Sphingosin-1-phosphat-(S1P)-Stimulierung festzustellen war (Abb. 4.43). Über mögliche Mechanismen der differentiellen Oberflächenexpression wie Rezeptordimerisierung, Koexpression mit Rezeptoraktivitäts-modifizierenden Proteinen (RAMPs) oder zellspezifischer Proteintransport sowie entsprechende Beispiele aus der Literatur ist bereits in Kap. 5.10 diskutiert worden. Die Induktion des Oberflächentransports über unterschiedliche Stimuli wie S1P und einem unbekanntem Hitze-instabilen Serumprotein in verschiedenen Zellsystemen wie CHO-K1 und HeLa-Zellen läßt auf eine komplexe Regulation schließen, bei der es zum „Cross-Talk“ zwischen EDG6 und anderen EDG-Rezeptoren sowie anderen Rezeptoren mit Proteinliganden kommen könnte. Die Annahme einer derartigen Regulation ist nicht unwahrscheinlich, da mit EDG1, EDG3, EDG5, EDG6 und EDG8 zur Zeit bereits fünf EDG-Rezeptoren bekannt sind, die alle S1P als spezifischen Liganden binden. In Hinblick auf eine spezifische Aktivierung einzelner EDG-Rezeptoren mit S1P wäre es nur konsequent, wenn Zellen die Oberflächenexpression von EDG-Rezeptoren regulieren würden. Beispiele auf transkriptioneller Ebene sind bereits bekannt. So wird die Expression von EDG5 in embryonalen F9-Karzinomzellen der Ratte sowie in humanen HL-60 Leukämiezellen nach Induktion der Differenzierung innerhalb weniger Tage herunterreguliert (Sato *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998).

Eine strikte Kontrolle der Oberflächenexpression von EDG6 könnte auch eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben positiver Signale auf primären Zellen sowohl im Western-Blot, als auch in der FACS-Analyse bei dem Nachweis mit den neu generierten monoklonalen Antikörpern sein (Abb. 4.25, 4.27). Dabei könnte der EDG6-Rezeptor, wie bereits unter den entsprechenden Bedingungen in HeLa und CHO-K1-Zellen gezeigt, intrazellulär von der Zelloberfläche zurück-

gehalten werden, so daß keine Oberflächenexpression in der Durchflußzytometrie nachzuweisen wäre (Abb. 4.44, 4.43). Zudem ist sowohl bei einem differentiellen Oberflächentransport in Folge von Rezeptordimerisierung, als auch bei einer Regulation über RAMPs gezeigt worden, daß die jeweiligen Rezeptoren posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen ausgesetzt sind, die das Epitop blockieren und die Bindung der Antikörper verhindern könnten (White *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998; Kuner *et al.*, 1999; McLatchie *et al.*, 1998; Foord und Marshall, 1999). Letzteres würde sowohl in der Durchflußzytometrie, als auch im Western-Blot zu Schwierigkeiten mit der Antikörperbindung führen. Ferner ist eine bereits diskutierte Abspaltung der potentiellen N-terminalen Signalsequenz zwar unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen und könnte ebenfalls zu einem Verlust des Epitops und damit auch zum Verlust der Antikörperbindung führen, da die Antikörper gegen den N-Terminus des murinen EDG6-Rezeptors gerichtet sind. Daß der N-Terminus offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der Bindung der Antikörper hat, zeigen FACS-Analysen von N-terminal Hämagglutinin-(HA)-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor überexprimierenden Zellen, bei denen das N-terminal angehängte Epitop offensichtlich eine deutliche Reduktion der Antikörperbindung verursacht (Abb. 4.23). Ferner bleibt die Frage, ob die Signale in der Durchflußzytometrie, die mit den anti-murinen-EDG6 Antikörpern in permeabilisierten murinen 80/1-Zellen nachgewiesen wurden, tatsächlich EDG6-spezifisch sind, da auch diese Zellen kein EDG6-spezifisches Signal auf der Zelloberfläche zeigen (Abb. 4.24). Eine zellspezifische Regulation der aufgeführten möglichen Mechanismen wie Rezeptordimerisierung, Koexpression mit RAMPs oder die Regulierung des Proteintransports könnte erklären, warum die anti-murinen-EDG6 Antikörper in den verschiedenen Überexpressionssystemen im Gegensatz zu den primären Zellen signifikante Signale liefern (Abb. 4.22, 4.26). Schließlich bleibt auch die Möglichkeit offen, daß der EDG6-Rezeptor im endogenen System nur in geringen Raten exprimiert wird und daher kein deutliches Signal der Antikörper auf primären Zellen sichtbar wird. Die Stimulierung primärer muriner Milzzellen mit verschiedenen Zellmitogenen zeigte diesbezüglich keine Wirkung (Kap. 4.7.3).

Der freie N-Terminus des EDG6-Rezeptors ist nicht nur für die Bindung der anti-murinen-EDG6 Antikörper entscheidend, sondern spielt ganz offensichtlich auch eine bedeutende Rolle beim zellspezifischen Oberflächentransport, da die N-terminal HA-Epitop-markierten Rezeptorkonstrukte in HeLa-Zellen konstitutiv auf der Zelloberfläche nachweisbar und nicht mehr dem beschriebenen differentiellen Oberflächentransport unterworfen sind (Abb. 4.45, 4.46). Daß verschiedene C-terminale Aminosäurereste einen Einfluß auf den Oberflächentransport diverser G-Protein-gekoppelter Rezeptoren haben, ist bereits gezeigt worden (Shapiro *et al.*, 1996; Schüle *et al.*, 1998). Inwiefern dabei jedoch ein freier N-Terminus eine Rolle spielen kann, bleibt unklar.

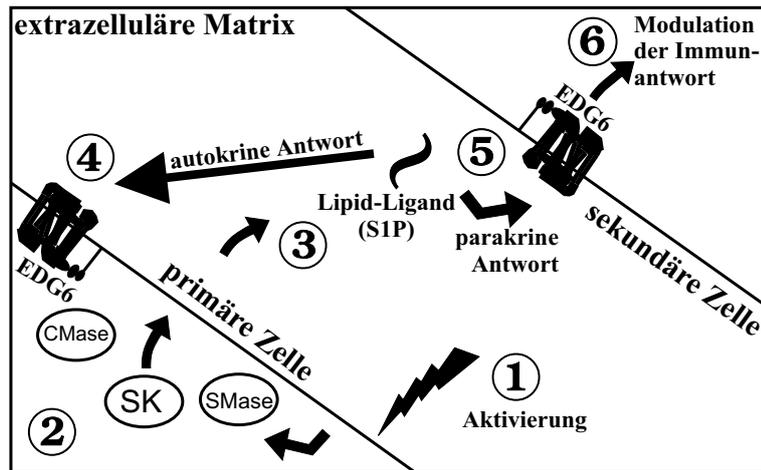


Abbildung 5.1: Modell der möglichen Funktion von EDG6 bei der Immunüberwachung. Nach Aktivierung primärer Zellen (1) wird die Synthese von Signallipiden wie Sphingosin-1-phosphat (S1P) durch Sphingomyelinasen (SMase), Ceramidasen (CMase) und Sphingosinkinasen (SK) ausgelöst (2), die anschließend in den extrazellulären Raum sekretiert werden (3). S1P kann dann eine mögliche autokrine Antwort durch Stimulierung von EDG6 auf den primären Zellen (4) oder aber eine parakrine Antwort durch Stimulierung von EDG6 auf sekundären Zellen, die sich in lokaler Nachbarschaft zu den primären Zellen befinden, auslösen (5). Die Stimulierung von EDG6 könnte zu einer Modulation der Immunantwort in Verbindung mit anderen Signalmolekülen führen (6).

Man könnte diesbezüglich auf eine entsprechende Funktion der potentiellen Signalsequenz spekulieren, die nur als terminale Sequenz wirksam ist (Abb. 4.4). Eine andere Möglichkeit ist die Interaktion mit zusätzlichen Molekülen wie RAMPs, die die Oberflächenexpression regulieren und mit dem freien N-Terminus des Rezeptors interagieren könnten (Foord und Marshall, 1999).

5.12 edg6-defiziente Mäuse als *in vivo*-Tiermodell

Obwohl durch die vorliegende Arbeit bereits viele aufschlußreiche Eigenschaften des EDG6-Rezeptors aufgedeckt werden konnten, kann bislang nur wenig über die mögliche *in vivo*-Funktion dieses Membranproteins gesagt werden. Wegen des auffälligen Expressionsmusters in Zellen und Organen des lymphatischen Systems sowie diverser Untersuchungen bezüglich der Signaltransduktion, zellulärer Effekte und regulatorischer Prozesse kann über eine mögliche Funktion im Immunsystem spekuliert werden (Abb. 5.1). Denkbar ist, daß primäre Zellen nach Aktivierung aufgrund eines immunologischen Ereignisses wie beispielsweise einer Infektion Lipidderivate über verschiedene Enzyme wie Ceramidasen, Sphingomyelinasen oder Phospholipasen produzieren und in die extrazelluläre Matrix freisetzen. Sphingosin-1-phosphat als eines dieser sekretierten Lipidderivate könnte anschließend auf der gleichen Zelle EDG6 aktivieren und eine autokrine

Antwort auslösen. Möglich ist auch eine parakrine Antwort, die über die Aktivierung von EDG6 auf benachbarten sekundären Zellen ausgelöst werden könnte. Vermutlich führt die Aktivierung des EDG6-Rezeptors zu einer Modulation der Immunantwort, die mit anderen zellulären Antworten wie beispielsweise der verstärkten Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren interagiert. Ein mögliches Ergebnis der EDG6-Aktivierung könnte unter anderem eine verstärkte Immunantwort sein. Die Überprüfung dieses Modells *in vivo* steht noch aus. Aufgrund der Komplexität des Immunsystems haben sich Tiermodelle zur Funktionsbestimmung immunologisch relevanter Rezeptoren als unerlässlich erwiesen (Förster *et al.*, 1996; Förster *et al.*, 1999). Aus diesem Grund ist ein embryonaler Stammzellklon generiert worden, bei dem auf einem Allel durch homologe Rekombination mit einem entsprechenden Vektorkonstrukt (Abb. 4.7) das funktionelle *edg6*-Gen deletiert wurde (Abb. 4.10). Aus diesem Klon werden *edg6*-defiziente Mäuse generiert, deren Phänotyp von der nicht mehr bereitgestellten Funktion des EDG6-Rezeptors abhängt, und die somit Aufschluß über die *in vivo*-Funktion von EDG6 geben. Bisläng ist noch kein derartiges Tiermodell eines EDG-Rezeptors publiziert worden, und es bleibt abzuwarten, welche Rolle diese neue Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in lebenden Organismen spielen. Die diskutierten zellulären Funktionen wie die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (Abb. 4.32) und der Phospholipase C (Abb. 4.34), die Induktion der Zytoskelettveränderungen (Abb. 4.35) oder die erhöhte Spontanmigration (Abb. 4.39) lassen einen entsprechend ausgeprägten Phänotyp der *edg6*-defizienten Mäuse vermuten.

