

Abbildung 4.2: Ergebnis der 5'-RACE-PCR

Herstellung für eine entsprechende 5'-RACE-PCR wurde die Sequenz des Klon mit dem EMBL-EST Datenbankeintrag AA254425 verwendet. Der Klon enthält ein murines Fragment, das zu 88% mit der humanen *edg6*-cDNA-Sequenz in dem entsprechenden Bereich übereinstimmt und somit als homologes murines Fragment zur humanen *edg6*-cDNA angesehen werden kann (Abb. 4.1). Desweiteren ist als Template-DNA der Ansatz einer reversen Transkription (Kap. 3.10.1) von der Gesamt-RNA aus der murinen dendritischen Zelllinie 18BE10 verwendet worden (Elbe *et al.*, 1994), da das humane Homolog aus *in vitro*-differenzierten dendritischen Zellen isoliert werden konnte und es daher wahrscheinlich war, daß die *edg6*-cDNA im murinen Organismus ebenfalls von dendritischen Zellen exprimiert wird.

4.1.1 Primer-Design

Die genspezifischen Primer für die 5'-RACE-PCR sind wie in Abbildung 4.1 angegeben gewählt worden. Dabei ist der GSP2 Primer so gelegt worden, daß er unmittelbar vor dem Stopkodon endet, um eine zusätzliche Glycin- und Prolin-reiche Unterbrechungssequenz, gefolgt von einer *myc*-Epitop-Sequenz anzuhängen (PGGSGP-EQKLISEEDLL, Kap. 2.7), die es in späteren Versuchen ermöglichen sollte, die Expression des murinen EDG6-Rezeptors mit einem anti-*myc*-Epitop Antikörper nachzuweisen (Emrich *et al.*, 1993). Da mit der 5'-RACE-PCR bereits die vollständige kodierende Sequenz amplifiziert werden konnte, wurde auf eine 3'-RACE-PCR verzichtet. Aus diesem Grunde ist die amplifizierte *edg6*-cDNA am 3'-Ende unvollständig.

4.1.2 5'-RACE-PCR

Die RACE-PCR ist eine Methode, die für die Amplifizierung von cDNA-Enden verwendet wird. Sie ist wie in Kap. 3.10.3 beschrieben mit mRNA der Zelllinie 18BE10 (Elbe et al, 1994) durchgeführt worden. Abweichend vom Standardprotokoll (Frohman, 1994) war vor allem der Einsatz von jeweils 10 μ l Template-DNA für die beiden Amplifizierungsschritte sowie eine zusätzliche Abtrennung von Oligonukleotiden vor dem zweiten Amplifizierungsschritt wichtig. Außerdem wurde zu jedem PCR-Ansatz 10% DMSO zugegeben, was die Spezifität sowie die Ausbeute deutlich erhöhte.

Die 5'-RACE-PCR lieferte ein Fragment mit einer Größe von etwa 1800 bp (Abb. 4.2). Das Fragment wurde isoliert (Kap. 3.15.1) und nach Glättung der DNA-Enden (Kap. 3.17.3) mit *Hin*DIII (A/AGCTT, Schnittstelle im Q1 Primer) geschnitten (Kap. 3.17.1). Nach einem Restriktionsverdau des Vektors pZerO-2 (Kap. 2.3) mit *Hin*DIII und *Eco*RV (GAT/ATC) wurde das RACE-PCR Produkt in den pZerO-2-Vektor kloniert (Kap. 3.18). Die Sequenzierung (Kap. 3.19) brachte das in Abb. 4.3 dargestellte Ergebnis. Die Diskrepanz zwischen der Größe des sequenzierten cDNA-Fragments (1680 bp) und der Größe des im Agarosegel aufgetrennten 5'-RACE-PCR Produkts (1800 bp) ist auf die 3'-Polyadenylierung nach der reversen Transkription zurückzuführen, bei der etwa 120 bp einer poly(A)-Sequenz angehängt wurden (Kap. 3.17.4).

4.1.3 Kodierende Sequenz und Homologie

Die neu amplifizierte murine cDNA-Sequenz zeichnet sich durch einen 500 bp umfassenden 5'-nichttranslatierten Bereich aus, der eine repetitive B1-Sequenz enthält (bp 1-99, Abb. 4.3). Der offene Leserahmen besteht aus 1158 bp und kodiert für 386 Aminosäuren. Die Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens (bp 500-1657) ist zu 80%, die Aminosäuresequenz zu 82% homolog zum humanen EDG6-Rezeptor. (Abb. 4.4). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des murinen und des humanen EDG6-Rezeptors sowie der sieben restlichen Mitglieder der humanen EDG-Rezeptorfamilie ist in Abb. 4.4 dargestellt. Die homologen EDG6-Rezeptoren haben eine mögliche Signalsequenz am N-Terminus und mögliche Postmodifikationsstellen gemeinsam.

4.2 Herstellung *edg6*-defizienter Mäuse

Um die *in vivo*-Funktion des EDG6-Rezeptors untersuchen zu können, wurde mit der Herstellung *edg6*-defizienter Mäuse begonnen. Dazu wurde zunächst die laboreigene λ -Phagenbank durch Hybridisierung mit Hilfe einer spezifischen murinen *edg6*-Sonde durchmustert. Aufgrund

<u>TTTTTCGAGA</u>	<u>CAGGGTTTCT</u>	<u>CTGTGTAGCC</u>	<u>CTGGCTGTCC</u>	<u>TGGAATCAC</u>	<u>TTATAGACC</u>	<u>AGGCTGGCCT</u>	70
<u>CGAACTCAGA</u>	<u>AATCCGCTG</u>	<u>CCTCTGCCTA</u>	<u>TGGCAGCCTT</u>	<u>TCTGTGTACA</u>	<u>GTTGACAAAT</u>	<u>ACTTATTAGG</u>	140
<u>CACCTGCTGT</u>	<u>ATATATAAGC</u>	<u>ATACAGTTGG</u>	<u>AACAGTTGGG</u>	<u>CACAAGGGGG</u>	<u>TGGGCAGAGG</u>	<u>GATCTTGGAT</u>	210
<u>GCCAGGCTAT</u>	<u>GCCCATTGTC</u>	<u>CAGTAGTGAC</u>	<u>TCCCCATCTA</u>	<u>GTGCTTGCCT</u>	<u>CCCATCCAAA</u>	<u>GAGGGAAATT</u>	280
<u>TGGTCCTGGG</u>	<u>TGGGGTGCCA</u>	<u>TGAGAGATCA</u>	<u>TGCTCTCTAG</u>	<u>CTCAGAG_{ccc}C</u>	<u>CCAGAGTCAT</u>	<u>ACCCACAGTT</u>	350
<u>GCTCAGGATG</u>	<u>CCCCTCCCTG</u>	<u>CCCTGGCCTC</u>	<u>ACCCCACCC</u>	<u>ACTCTGGGGC</u>	<u>ACCTTGAGCA</u>	<u>TAACAGGAAA</u>	420
<u>TTTCAAACAA</u>	<u>CAGGAAACCC</u>	<u>AGGCCAGGCA</u>	<u>GTGACTCCAC</u>	<u>CCTGCGGAGG</u>	<u>CCTCTCTCAG</u>	<u>TCTGTCCCCG</u>	490
<u>GGGGGGGCCA</u>	<u>TGAACATCAG</u>	<u>TACCTGGTCC</u>	<u>ACGCTGGTGA</u>	<u>CCCAGAGTC</u>	<u>CTGCCACCGG</u>	<u>CTGGCAGCCA</u>	560
<u>GCGGCCACAG</u>	<u>CCTCCTCATT</u>	<u>GTCTGCACT</u>	<u>ACAATCACAG</u>	<u>CGGCAGGCTG</u>	<u>GCCAGCCGCG</u>	<u>GGGGCTCTGA</u>	630
<u>GGACGGTGGG</u>	<u>GGGTAGGGA</u>	<u>TGCTGAGGGG</u>	<u>GCCGTCGGTG</u>	<u>GCCGCAGGTT</u>	<u>GCCTGGTGGT</u>	<u>GCTGGAGAAC</u>	700
<u>GCCATGGTGC</u>	<u>TGGCCGCCAT</u>	<u>CGCCATCTAC</u>	<u>ATGCGGTCCC</u>	<u>GCCGCTGGGT</u>	<u>GTA_{ACTACTGC}</u>	<u>CTGCTGAACA</u>	770
<u>TCACACTGAG</u>	<u>TGACCTGCTC</u>	<u>ACAGGCCTGG</u>	<u>CCTACGTGGT</u>	<u>CAACGTGCTG</u>	<u>CTGTCAGGGA</u>	<u>CTCGTACCTT</u>	840
<u>CCAGTGTC</u>	<u>CCGGTGCCT</u>	<u>GGTTCCTGCG</u>	<u>GGAGGGCCTG</u>	<u>CTCTTCATGG</u>	<u>CCTTGGCCGC</u>	<u>ATCCACCTTC</u>	910
<u>AGTCTGCTCT</u>	<u>TCACGGCCGG</u>	<u>CGAGCGCTTC</u>	<u>GCCACCATGG</u>	<u>TGCGGGTGGC</u>	<u>TGAGAGTGGG</u>	<u>GCCACCAAGA</u>	980
<u>CCAGCCGTGT</u>	<u>GTATGGCTGC</u>	<u>ATCGGTCTGT</u>	<u>GCTGGCTACT</u>	<u>GGCAGCTATC</u>	<u>CTGGGCCTGC</u>	<u>TGCCCTGCT</u>	1050
<u>GGGCTGGAAC</u>	<u>TGTGTGTGCG</u>	<u>CCTTCCCACG</u>	<u>CTGCTCCAGC</u>	<u>CTGCTGCCCC</u>	<u>TCTACTCCAA</u>	<u>GGGCTATGTG</u>	1120
<u>CTCTTTTGTG</u>	<u>TGGTGGTCTT</u>	<u>CGCCCTCATC</u>	<u>CTAGTGGCTA</u>	<u>TCCTGAGCCT</u>	<u>CTACGGGGCC</u>	<u>ATCTTTAGAG</u>	1190
<u>TGGTCCGAGC</u>	<u>CAATGGGCAG</u>	<u>AAGTCTCCAC</u>	<u>GTCCTCTGCG</u>	<u>CCGCGCAAG</u>	<u>TCCGCAGGC</u>	<u>TACTCAACAC</u>	1260
<u>CGTGTGTATG</u>	<u>ATCTTGGTGG</u>	<u>CCTTTGTGGT</u>	<u>GTGCTGGGGT</u>	<u>CCCCTGTTG</u>	<u>GCCTGCTCCT</u>	<u>GGCTGACATC</u>	1330
<u>TTTGGTTCTA</u>	<u>ATGTCTGGGC</u>	<u>CCAGGAGTAC</u>	<u>CTGCGTGGCA</u>	<u>TGGACTGGAT</u>	<u>CCTGGCCCTG</u>	<u>GCCGTGTTCA</u>	1400
<u>ACTCAGCCAT</u>	<u>TAATCCTCTC</u>	<u>ATCTACTCCT</u>	<u>TCCGCAGCCG</u>	<u>TGAGGTGCAG</u>	<u>CGCGCTGTGC</u>	<u>TGGCCTTCCT</u>	1470
<u>GTGCTGCGGC</u>	<u>TGTCTCTGGC</u>	<u>TAGGTCTGCG</u>	<u>AGGTCAGGA</u>	<u>GACTGCCTGA</u>	<u>CCGGATCAC</u>	<u>CGAGGCCAC</u>	1540
<u>TCCGGTGCAT</u>	<u>CCACCACTGA</u>	<u>CAGCTCCCTG</u>	<u>AGGCCAGGG</u>	<u>ACAGTTTTCG</u>	<u>GACTTCTCGG</u>	<u>TCACTCAGCT</u>	1610
<u>TCAGGATGAG</u>	<u>AGAGCCGCTG</u>	<u>TCCAGCATTT</u>	<u>CCAGCGTCCG</u>	<u>CAGCACCCCT</u>	<u>GGAGGATCTG</u>	<u>GGCCCCAGGC</u>	1680

Abbildung 4.3: Sequenz des 3'-unvollständigen murinen *edg6*-cDNA-Fragments der 5'-RACE-PCR. Eine repetitive B1-Sequenz (bp 1-99), das Startkodons (bp 500), eine interne *Bam*HI-Restriktionssequenz (G/GATCC, bp 1377-1382) sowie der Beginn der angehängten *myc*-Epitop-Sequenz (bp 1658-1680) sind unterstrichen. Die Sequenz (bp 1-1657) hat den EMBL-Datenbankeintrag AJ006074.

der Tatsache, daß die murine *edg6*-cDNA-Sequenz der 5'-RACE-PCR (Kap. 4.1.2) zu diesem Zeitpunkt noch nicht verfügbar war, wurde zur Herstellung der murinen *edg6*-Sonde Gesamt-RNA aus 18BE10-Zellen (Elbe *et al.*, 1994) revers transkribiert (Kap. 3.10.1). Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Primern 3'-Primer und GSP2 (Kap. 2.7) wurde ein 464 bp großes Fragment der murinen *edg6*-cDNA (bp 1217-1680, Abb. 4.3) amplifiziert (PCR-Bedingungen: (1) 94°C, 5min; (2) 94°C, 60sek; (3) 50°C, 60sek; (4) 72°C, 1,5min; 35 Zyklen (2-4)). Als Vorlage für die Herstellung des 3'-Primers diente der EMBL-Datenbankeintrag AA451451, dessen Sequenz mit dem 5'-Ende des EMBL-Datenbankeintrags AA254425 (Abb. 4.1) überlappte und somit ebenfalls als Fragment der murinen *edg6*-cDNA angesehen werden konnte. Das PCR-Produkt wurde nach Restriktion mit *Apa*I (GGGCC/C) in den ebenfalls mit *Apa*I linearisierten pZerO-2-Vektor kloniert (Kap. 3.17.1, 2.3, 3.18), wobei das murine *edg6*-cDNA-Fragment eine Größe von 309 bp hatte (bp 1347-1655, Abb. 4.3). Dieses Fragment wurde für das Durchmustern der laboreigenen λ -Phagenbank verwendet (Kap. 3.12). Nachdem die Suche nach einem murinen *edg6*-genomischen DNA-Klon in dieser Genbank und schließlich auch in

		N		N		TM1	
mEDG6	1	MNIS	---	TWSTLVTPE	SCHRLA	-ASGHSLLV	LVHYNHSGRLAS
hEDG6	1	MNA	---	TGTPVAPE	SCQOLA	-AGGHSRLIV	LHYNHSGRLAGR
hEDG1	1	MGP	---	TSVPLVKA	HRSSVSD	-YV-NYDI	IVRHYNVTGKLN-I-SADKENS
hEDG2	1	MAA	IST	SIPVISQ	PQFTAMNE	PQCFYNES	IAFFYNRS
hEDG3	1	MAT	---	ALPPRLQ	PVRG	-----	NETLREHYQYVGKLAGR-LKEASEG
hEDG4	1	-----	-----	LMVIMG	---	QCYYNET	IGFFYNN
hEDG5	1	MGG	---	LYSEYLN	PEKV	-----	QEHYNYTKETL
hEDG7	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
hEDG8	1	-----	-----	MESGLLR	PAPVS	-----	EVIVLHNYTGKLRG-ARYQPGAGLR
				P		TM2	
mEDG6	70	VLA	AAIAI	YMR	SRF	WVYYC	LLNITLSDLLTGLAYVVNVLLSGT
hEDG6	67	VLA	AIT	SHMR	SRF	WVYYC	LVNITLSDLLTGAAYLANVLLSGA
hEDG1	66	VLL	T	IWK	T	KKFFH	P
hEDG2	70	VMVA	I	YVNR	RRF	HH	P
hEDG3	60	VLIA	I	WKN	NK	FHN	R
hEDG4	53	VIA	A	IAS	N	RRF	H
hEDG5	54	VLIA	A	VARN	SK	FHS	A
hEDG7	51	VIA	A	VIK	N	RK	F
hEDG8	57	VLL	V	LGR	H	PR	F
						TM3	
mEDG6	142	TAG	ERF	FAT	MVR	-VAESG	ATKTSR
hEDG6	139	TAG	ERF	FAT	MVR	-VAESG	ATKTSR
hEDG1	138	TAI	E	R	I	T	M
hEDG2	142	TAI	E	R	H	I	T
hEDG3	132	TAI	E	R	H	L	T
hEDG4	125	IAV	E	R	H	S	V
hEDG5	126	IAI	E	R	Q	V	A
hEDG7	123	IAV	E	R	H	S	I
hEDG8	129	IAI	E	R	S	L	T
						TM4	
mEDG6	213	VF	ALIL	VAIL	SLYG	AIFR	VVRANGQKSPRP
hEDG6	211	IF	A	G	V	L	A
hEDG1	209	V	T	L	L	S	I
hEDG2	213	F	N	L	V	T	I
hEDG3	203	I	N	L	V	T	I
hEDG4	196	S	S	L	L	V	F
hEDG5	197	I	F	S	V	I	L
hEDG7	194	S	N	L	M	A	F
hEDG8	200	A	F	V	G	I	L
						TM5	
mEDG6	274	LAD	IF	GS	NVWAQ	EYLRG	MDWILALAVFNSAINPLIYSFRS
hEDG6	272	LAD	IF	GS	NVWAQ	EYLRG	MDWILALAVLNSAVNPIIYSFRS
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						TM6	
mEDG6	336	P	---	GDCL	TRITEA	HSGAS	-TTDSSLRPRD
hEDG6	334	P	---	GDCL	RAVEA	HSGAS	-TTDSSLRPRD
hEDG1	339	K	F	K	R	P	I
hEDG2	337	P	T	E	S	S	D
hEDG3	323	A	R	A	S	P	A
hEDG4	321	E	S	V	H	T	S
hEDG5	315	R	R	G	N	F	G
hEDG7	320	P	S	-	R	I	P
hEDG8	343	E	A	S	G	L	R
						TM7	
mEDG6	274	LAD	IF	GS	NVWAQ	EYLRG	MDWILALAVFNSAINPLIYSFRS
hEDG6	272	LAD	IF	GS	NVWAQ	EYLRG	MDWILALAVLNSAVNPIIYSFRS
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-
						L	
mEDG6	274	LAD	I	F	G	S	N
hEDG6	272	LAD	I	F	G	S	N
hEDG1	277	LL	D	V	G	-	CKV
hEDG2	279	LL	D	-	V	C	P
hEDG3	264	L	I	D	V	A	-
hEDG4	262	L	L	D	G	L	C
hEDG5	254	L	L	D	S	T	-
hEDG7	260	L	L	D	G	L	N
hEDG8	272	L	L	D	V	A	-

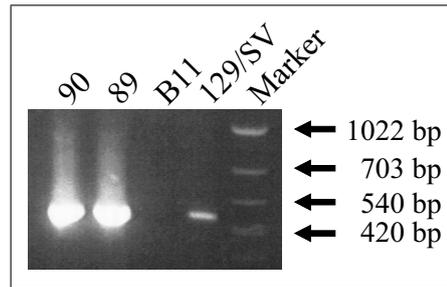


Abbildung 4.5: Kontroll-PCR der P1-Klone 89 und 90, die die murine genomische *edg6*-DNA enthalten sowie des leeren P1-Klons B11 als Negativ- und genomische DNA aus 129/SV Mäusen als Positivkontrolle. Die PCR wurde mit den Primern GSP2 und 3'-Primer durchgeführt (465 bp-Fragment, Kap. 2.7).

der BAC-(bacterial artificial chromosome)-Genbank (Genome Systems) aus 129/SV-Mäusen erfolglos verlief, konnten in der P1-Phagenbank (Genome Systems) die beiden Klone 89 und 90 aus 129/OLA-Mäusen isoliert werden, die in der PCR mit den Primern GSP2 und 3'-Primer sowie der entsprechenden Phagen-DNA positiv waren (Abb. 4.5, 464 bp-Fragment, bp 1217-1680, Abb. 4.3, PCR-Bedingungen: (1) 94°C, 10min, ohne Polymerase; (2) 75°C, 10min, Zugabe der Polymerase; (3) 94°C, 30sek; (4) 57°C, 30sek; (5) 72°C, 1min; 35 Zyklen (3-5); (6) 72°C, 7min). Das Durchmustern der P1-Phagenbank wurde mittels PCR und den Primern GSP2 und 3'-Primer von der Firma Genome Systems durchgeführt.

4.2.1 Subklonierung der murinen genomischen *edg6*-DNA

Für die weitere Subklonierung wurde der P1-Klon 89 ausgewählt (Abb. 4.5). Um die 3'- und 5'- flankierenden genomischen Bereiche der kodierenden murinen *edg6*-DNA zu erhalten, wurde die DNA des P1-Klons 89 mit *Bam*HI und jeweils einem von 22 weiteren Restriktionsenzymen gespalten (Abb. 4.6). Während *Bam*HI die kodierende *edg6*-DNA intern schneidet, liegen die Schnittstellen der anderen Restriktionsenzyme außerhalb dieses Bereiches. Durch Restriktion des murinen *edg6*-Vollängklons (Abb. 4.3) mit *Sma*I (CCC/GGG) und *Apa*I (GGGCC/C) wurde ein cDNA-Fragment erhalten, das als Digoxigenin-markierte Sonde für den 5'-flankierenden genomischen Bereich verwendet wurde (863 bp-Fragment, bp 489-1347). Als entsprechende Sonde für den 3'-flankierenden genomischen Bereich wurde das gleiche cDNA-Fragment wie in Kap. 4.2 verwendet, jedoch ebenfalls mit Digoxigenin-markiert (309 bp-Fragment, bp 1347-1655, Abb. 4.3). Das Ergebnis der Restriktionen und der Hybridisierungen mit den beiden Sonden ist in Abb. 4.6 dargestellt. Für die Subklonierung des 5'-flankierenden genomischen Bereiches wurde das *Pst*I/*Bam*HI-Fragment (2,5kb), für die des 3'-flankierenden genomischen Bereiches das *Aat*II/*Bam*HI-Fragment (6kb) verwendet.

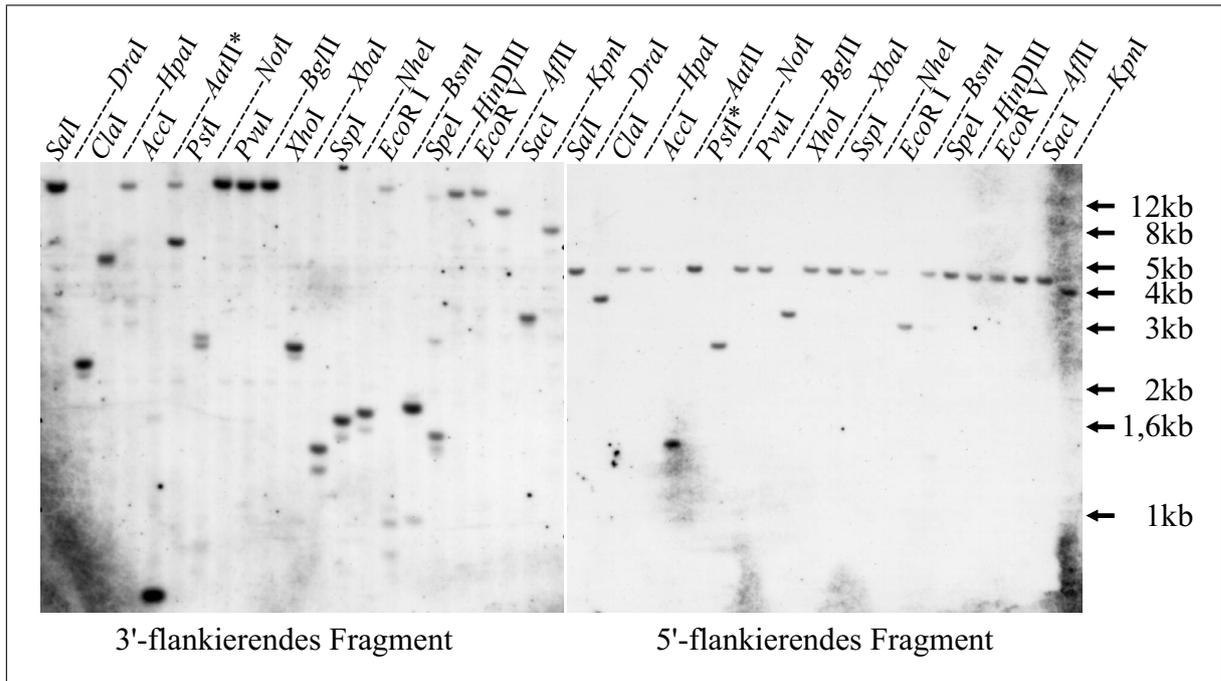


Abbildung 4.6: Restriktionsanalyse des P1-Klons 89, der die genomische Sequenz des murinen *edg6*-Gens enthält. Alle Ansätze wurden neben den angegebenen Restriktionsenzymen zusätzlich mit *Bam*HI gespalten, das die murine *edg6*-DNA innerhalb des kodierenden Bereiches schneidet (bp 1378, siehe Abb. 4.3). Spezifische Sonden für die 5'- und 3'-flankierenden genomischen Bereiche machen die Größe der jeweils erhaltenen flankierenden Fragmente ab der internen *Bam*HI-Schnittstelle sichtbar. Die Fragmente der mit (*) gekennzeichneten Restriktionen sind subkloniert worden.

4.2.2 Herstellung des *edg6*-defizienten Vektorkonstrukts

Das 5'-flankierende genomische *Pst*I/*Bam*HI-Fragment (2,5kb, Kap. 4.2.1) wurde in den entsprechend geschnittenen pZerO-2-Vektor, das 3'-flankierende genomische *Aat*II/*Bam*HI-Fragment (6kb, Kap. 4.2.1) in den pGem-7Zf(+)-Vektor kloniert (Kap. 3.18, 2.3). Anschließend wurde der 5'-flankierende genomische Klon mit *Sma*I (CCC/GGG) und *Bam*HI (G/GATCC) geschnitten und das Fragment, das die ersten 293 Aminosäuren des murinen EDG6-Rezeptors kodiert (bp 489-1378, Abb 4.3), verworfen. In den geschnittenen Vektor wurde das mit *Xho*I (C/TCGAG) geschnittene, mit T4-Polymerase geglättete (Kap. 3.17.3) und mit *Bam*HI nachgeschnittene Neomycin-Resistenzgen inklusive Thymidinkinase-Promotor und Polyadenylierungssignalsequenz aus dem pMC1neoPolyA-Vektor einkloniert (Kap. 2.3). Dieses 5'-*medg6*-gen→*neo*PA Konstrukt wurde mit *Bam*HI und *Xba*I (T/CTAGA) aus dem pZerO-2-Vektor geschnitten und nach entsprechender Restriktion in den pBlueskript II KS(+)-Vektor kloniert. Schließlich ist dieses Vektorkonstrukt ein weiteres Mal mit *Bam*HI und *Sma*I geschnitten und das mit *Aat*II

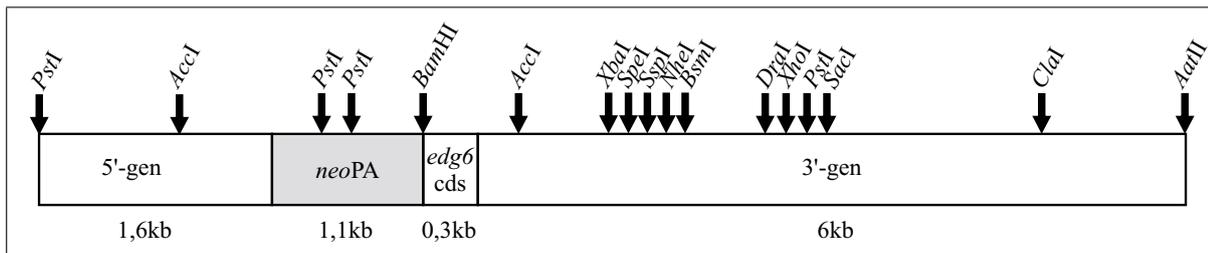


Abbildung 4.7: Struktur des *edg6*-defizienten Vektorkonstrukts. Die aus der Restriktionsanalyse (Abb. 4.6) hervorgehenden Schnittstellen sowie die Größe der einzelnen Komponenten sind eingezeichnet. Das 5'-Ende der kodierenden *edg6*-Sequenz (bp 489-1378, Abb. 4.3) ist durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt (*neoPA*), so daß nur noch ein 3'-Restfragment der kodierenden *edg6*-Sequenz (*edg6*-*cds*, bp 1378-1657, Abb. 4.3) vorhanden ist und kein funktioneller Rezeptor mehr ausgebildet werden kann.

(GACGT/C) geschnittene, mit T4-Polymerase geglättete und mit *Bam*HI nachgeschnittene 3'-genomische Fragment aus dem pGem-7Zf(+)-Vektor inkloniert worden. Eine Übersicht dieses 5'-*medg6*-gen→*neoPA*→3'-*medg6*-gen Konstrukts ist in Abb. 4.7 dargestellt.

4.2.3 Generierung homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen

Um das *edg6*-defiziente DNA-Konstrukt mit Hilfe der homologen Rekombination in das Genom muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) unter Austausch des endogen kodierten *edg6*-Gens einzufügen, wurde das Vektorkonstrukt mit *Hin*DIII linearisiert (Kap. 3.17.1) und die ES-Zellen elektroporiert (Kap. 3.2.5). Die G418-resistenten ES-Zellklone wurden isoliert (Kap. 3.2.6) und auf den Austausch des *edg6*-Gens mit dem *edg6*-defizienten Konstrukt hin untersucht.

4.2.4 Selektion homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen

Selektion mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Für die Auswahl der ES-Zellklone wurde eine Vorselektion mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dabei wurde die Gesamt-DNA der ES-Zellklone aus 96-Lochplatten isoliert (Kap. 3.15.3) und als Template-DNA für PCR-Analysen verwendet (Kap. 3.10.2). Um Primer für die PCR herstellen zu können, die jenseits des klonierten genomischen 5'-flankierenden Bereiches des homolog rekombinierten *edg6*-defizienten Konstrukts liegen und daher mit einem Gegenprimer aus dem Bereich des Neomycin-Resistenzgens den spezifischen Austausch des endogenen *edg6*-Gens mit dem *edg6*-defizienten Konstrukt nachweisen können, wurde der genomische P1-Klon 89 mit *Bam*HI (G/GATCC) geschnitten und die Bande, die bei etwa 4,5kb mit der Sonde für den 5'-flankierenden genomischen Bereich hybridisierte

CTGCAGGTCC	AGGAGCTGCC	AAGTGGGGAA	GCCAGCCCAC	AGGGAGAGAG	TCCCTGCTTC	CTACTGGGCC	70
CCCAAGCCCA	GCTCCCTGT	AATTTATTCC	CTGCCCTTC	TTCTAGTTGT	TGGAGAAAG	ACATGAGCCG	140
GGTCTTTAAC	CCCAGCGCTC	CGGAGGCAGA	GGCAGGAGGA	TTTCTGTGAG	TCCAGGACC	ATGTTTTCAA	210
AAACAAACAA	AACCGGATAG	AACTGTCCGG	GACCTTGTA	CTCCCAGGG	GCCCTGTTC	CATCTTCCTG	280
TGGGGACCAT	TTCATCTTAC	CAAAGGGGAA	ACCGAGGTCG	GCAAGATGGC	TGGTGAGAGT	GCCTTGCCAC	350
CAAGCCTGAC	AACTGGACTT	CAGGACCTGT	TCAGTGGACA	GAGAGAGGGA	GCGGAGTCCT	AGGAGAAGTT	420
CTCTATCTCC	TCAGGCGTGC	ATGGTGGTGA	CACACCTACC	CACACAGATA	AATAAATGTA	ATTTAAAAAC	490
AAACAATCAG	GGAAGTGGAG	AAGAGAGAAA	TATCTCAGCT	CTCAGGCGCT	GAGGCAGGAG	GATTGCAAGT	560
TTCATGTCTC	AAATTACAGC	TCAGTGTCTC	CACTGTGAGC	CTGGCAGGGG	CCAGGGCCAG	GGTATTGACT	630
CACAGAGACA	ATGTCAAATC	TAGGCACAGA	ATGGAGTAGG	GGGTTGGAGT	GGCTCGGAGG	GTAAAAATGCA	700
GGAGTTGGCA	ACTGCCCTGC	TCATCAACAA	GCCCCAGGTT	CGGTGAGAGA	CCCAGGGAGC	GACTGAAGAA	770
AACATCACAG	ACTAGGGTAT	AGAGCTGAGT	CATCTGGCT	TGTGTTTTGT	GTCCCTGTCA	CCAGTCAACC	840
CCACAACCCG	CCCATGCCTT	CCAAGCACTG	GAGTTAGAGA	TCTGGCTGTT	CTCAGGAGAA	TCCAGATGCA	910
GAGTAAGCTG	CACTTTACTA	ACTGAACTCC	CTCCAGCTTC	<u>CTTAGACATA</u>	<u>TCTCCTTACA</u>	CTGCTGCATA	980
GTAAGTCACT	CTGAGACACA	GAATGGCTTG	GTCTGGGTGC	TGGGGATGGC	AGCCAGAGTC	<u>TTAGGAATTC</u>	1050
TAAGCTGGAC	TCTACTGTTG	TTTTGTGCCT	GCCAACATTT	TTGCATCTAC	CTGAAGCATC	CCAGAGTATT	1120
GTCTTGTA	AGGGCCCTGG	TGCTGTCTTC	AGGGTGCATT	TCGGGCAGGG	AGATGGTACT	TGCCAGCTT	1190
GGTTACATAC	TCAAAGAGCA	AAGAGCTGTT	CTTTTTGGG	GGTTTTGGTTT	TGTTTGTGTTT	TATTTTGTGTTT	1260
TTGTTTTTTT	GAGACAGGGT	TTCTCTGTAT	AGCTCTGGCT	GTCCTGGAAC	TACTCTGTGA	GACCAGGCTG	1330
GCCTCGAACT	CAGAAATCTG	CCTGCCCTTG	CCTCCCAAGT	GCTGGGATTA	AAGCGTGC	CACCACGCCT	1400
GGCGAGAGCT	GTTCTTGAAG	<u>ACTGACTAAG</u>	<u>TGCTGCTGT</u>	<u>GGAGGTCAAG</u>	<u>TGTTGTAAT</u>	<u>CTTCTGTTCT</u>	1470
GTTATGGTGC	CTGCTTCATA	CCACATCAGC	TTCCATAGCA	GGCTGCAG			1518

Abbildung 4.8: Sequenz des *PstI* (CTGCA/G) -Fragments im 5'-flankierenden genomischen Bereich etwa 2,5kb bis 4kb vor der *edg6*-internen *BamHI*-Schnittstelle (G/GATCC, Abb. 4.3). Der überlapende 3'-nichttranslatierte Bereich des *Gna15*-Gens (bp 1-63, Abb. 4.15), die für die PCR-Reaktionen verwendeten Primer medg6g3 (bp 944-965) und medg6g1 (bp 1424-1445) sowie die aus der Restriktionsanalyse (Abb. 4.6) hervorgehenden *DraI* (TTT/AAA, bp 482-487) und *EcoRI* (G/AATTC, bp 1045-1050) -Schnittstellen sind unterstrichen.

(Kap. 4.2.1, Abb. 4.6), in den entsprechend geschnittenen pZerO-2-Vektor kloniert (Kap. 3.18, 2.3). Dieser pZerO-2-Vektor mit dem genomischen *BamHI*-Fragment des 5'-flankierenden murinen *edg6*-Gens wurde anschließend mit *PstI* (CTGCA/G) geschnitten. Dabei konnte unter anderem ein 1,5kb-Fragment isoliert werden, das wiederum in den entsprechend geschnittenen pZerO-2-Vektor subkloniert wurde. Dieses Fragment konnte sowohl mit *DraI* (TTT/AAA), als auch mit *EcoRI* (G/AATTC) in zwei 0,5kb und 1kb große Fragmente gespalten und somit anhand der Restriktionsanalyse (Abb. 4.6) in der richtigen Orientierung etwa 2,5kb bis 4kb vor der *BamHI*-Schnittstelle im *edg6*-Gen eingeordnet werden (Abb. 4.3). Die Sequenz ist in Abb. 4.8 dargestellt, wobei sich am 5'-Ende ein Teil des nichttranslatierten Bereiches der murinen *Gna15*-kodierenden Sequenz anschließt (Abb. 4.15). Aus diesem Bereich wurde der Primer medg6g3 gewählt (Abb. 4.8), der zusammen mit einem der Primer 3NeoPA1 oder 3NeoPA2 (Kap. 2.7), die als Gegenprimer fungierten und zu entsprechenden Sequenzen des Neomycin-Resistenzgens homolog sind, bei erfolgter homologer Rekombination PCR-Produkte mit einer Größe von etwa 2,6kb (3NeoPA2) oder 2,9kb (3NeoPA1) bildeten (Abb. 4.9, PCR-Bedingungen: (1) 94°C, 2min;

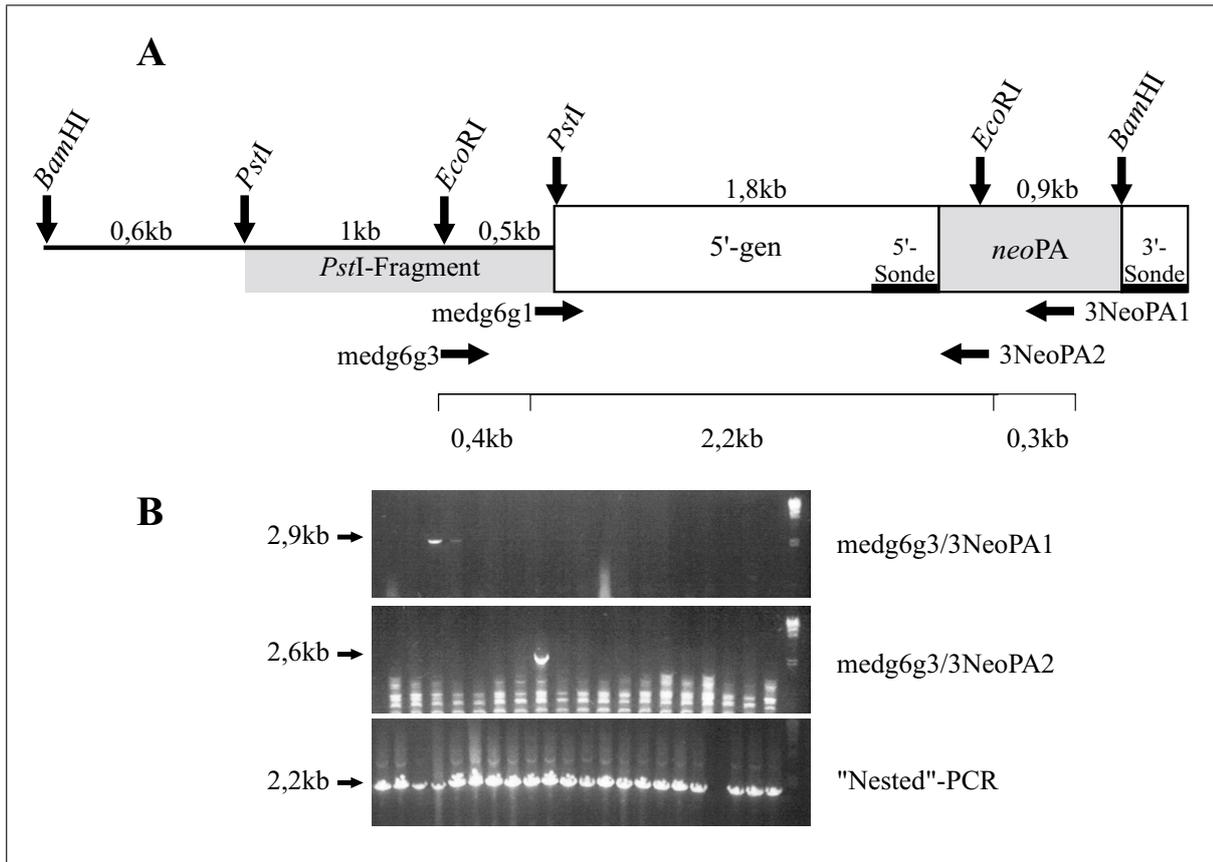


Abbildung 4.9: (A) Struktur des homolog rekombinierten 5'-Endes des *edg6*-defizienten DNA-Konstrukts. Die Lage des *PstI*-Fragments (Abb. 4.8), der PCR-Primer, der *PstI*, *EcoRI* und *BamHI*-Schnittstellen und der Sonden für den 5'- (bp 124-489, Abb. 4.3) und 3'- (bp 1347-1655, Abb. 4.3) flankierenden genomischen *edg6*-Bereich sowie die Größe der Fragmente zwischen den Schnittstellen und der zu erwartenden PCR-Amplifikate sind angegeben. (B) Beispiele für die PCR-Reaktionen mit den Primern medg6g3/3NeoPA1, medg6g3/3NeoPA2 sowie der „Nested“-PCR mit den Primerpaaren medg6g3/3NeoPA1 (1. Amplifikation) und medg6g1/3NeoPA2 (2. Amplifikation).

(2) 94°C, 1min; (3) 60°C, 1min; (4) 72°C, 2min; 35 Zyklen (2-4), (5) 72°C, 5min). ES-Zellklone, die sowohl mit den Primern medg6g3/3NeoPA1, als auch mit medg6g3/3NeoPA2 Produkte entsprechender Größe lieferten, wurden selektiert und anschließend einer „Nested“-PCR unterzogen, bei der 1µl des PCR-Reaktionsansatzes mit den Primern medg6g3/3NeoPA1 als Template-DNA für eine zweite PCR mit den Primern medg6g1/3NeoPA2 dienten (Abb. 4.8, 4.9). Von etwa 400 isolierten G418-resistenten ES-Zellklonen waren 33 Klone in der PCR-Analyse positiv. 16 dieser Klone sind für eine weitere Selektion mit Hilfe der Southern-Blot-Methode ausgewählt worden.

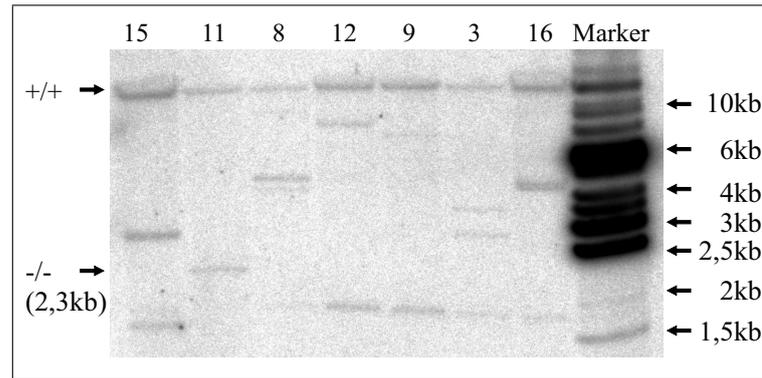


Abbildung 4.10: Southern-Blot verschiedener selektierter ES-Zellklone nach *EcoRI*-Restriktion und anschließender Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde für den 5'-flankierenden genomischen Bereich (bp 124-489, Abb. 4.3). Die Bande des *edg6*-Wildtyp-Gens (+/+) ist deutlich größer als 10kb, während die erwartete Bande nach erfolgter homologer Rekombination des *edg6*-defizienten DNA-Konstrukts (-/-) bei 2,3kb liegt (Abb. 4.9A). Klon 11 zeigt das erwartete Bandenmuster.

Selektion mit Hilfe der Southern-Blot-Methode

Für den spezifischen Nachweis der homologen Rekombination sind die embryonalen Stammzellklone (ES-Zellklone), die in der PCR-Analyse positiv waren (Kap. 4.2.4), mit Hilfe der Southern-Blot-Methode untersucht worden. Dazu wurde die genomische DNA der ES-Zellklone isoliert (Kap. 3.15.3) und über Nacht mit *EcoRI* geschnitten (Kap. 3.17.1). Nach dem Blot (Kap. 3.13.1) ist die genomische DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde für den 5'-flankierenden genomischen *edg6*-Bereich hybridisiert worden (Kap. 3.14.2). Das cDNA-Fragment für diese Sonde wurde durch Restriktion des murinen *edg6*-Vollängenklons mit *HinCII* (GTY/RAC) und *SmaI* (CCC/GGG) erhalten (bp 124-489, Abb. 4.3). Nach erfolgter homologer Rekombination wurde ein Hybridisierungssignal bei 2,3kb erwartet (Abb. 4.9A), das Hybridisierungssignal des *edg6*-Wildtyp-Gens war deutlich größer als 10kb (Abb. 4.10). Von den 16 untersuchten ES-Zellklonen hatte Klon 11 das erwartete Muster (Abb. 4.10). Dieser Klon wurde nach einer weiteren Southern-Blot Kontrolle mit einer radioaktiv markierten *neo*-Sonde (*EagI/NcoI*-Fragment aus pMC1neoPolyA, Kap. 2.3) für die Blastozysten-Injektion ausgewählt.

4.2.5 Blastozysten-Injektion und Uterus-Transfer

Die Blastozysten-Injektion des homolog rekombinierten embryonalen Stammzellklons sowie der Uterus-Transfer wurden in der Arbeitsgruppe Dr. Eckhard Wolf der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München durchgeführt. Die Arbeiten sind bis dato noch nicht abgeschlossen.

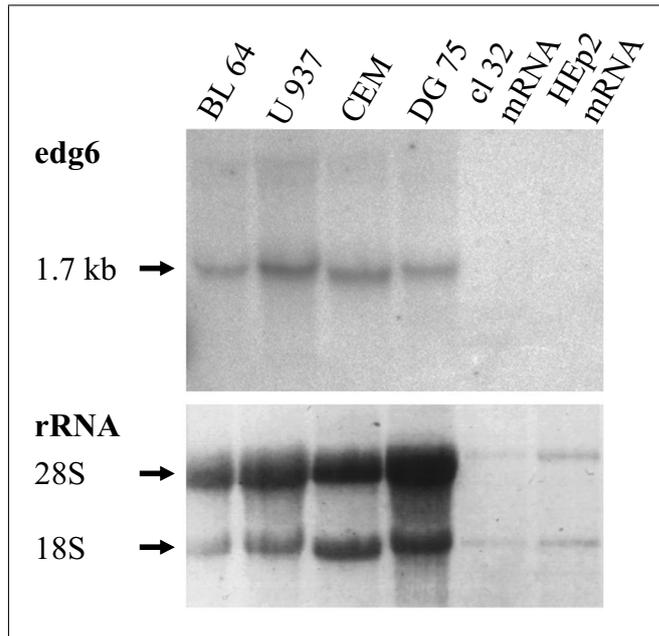


Abbildung 4.11: Northern-Blot mit Gesamt-RNA der humanen Burkitt-Lymphom B-Zelllinien BL64 und DG75, der promyelozytischen Zelllinie U937 und der lymphoblastoiden T-Zelllinie CEM sowie mit mRNA der Kehlkopfkrebs-Zelllinien HEP2 und cl32. Als Kontrolle ist die 28S und 18S-rRNA nach Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

4.3 RNA-Expression des EDG6-Rezeptors

Um einen ersten Eindruck über die mögliche Funktion des EDG6-Rezeptors zu bekommen, wurde dessen Expression auf RNA-Ebene in diversen humanen Zelllinien sowie in humanem und murinem Gewebe untersucht.

4.3.1 *edg6*-mRNA-Expression in humanen Zelllinien

Um die RNA-Expression in humanen Zelllinien nachweisen zu können, wurde eine radioaktiv markierte DNA-Sonde aus der humanen *edg6*-cDNA nach Restriktion mit *Pst*I (CTGCA/G) und *Aat*II (GACGT/C) hergestellt (bp 438-842, EMBL-Datenbankeintrag AJ000479). Diese Sonde wurde für die Hybridisierung eines Northern-Blots (Kap. 3.13.2) mit RNA-Proben diverser Zelllinien eingesetzt (Kap. 3.14.2). Das Ergebnis ist in Abb. 4.11 dargestellt. Der Blot zeigt eine Expression der *edg6*-mRNA in den Burkitt-Lymphom B-Zelllinien BL64 und DG75 und in der lymphoblastoiden T-Zelllinie CEM sowie in der promyelozytischen Zelllinie U937 bei einer Größe von etwa 1,7kb, während die Kehlkopfkrebs-Zelllinien HEP2 und cl32 keine *edg6*-mRNA exprimieren.

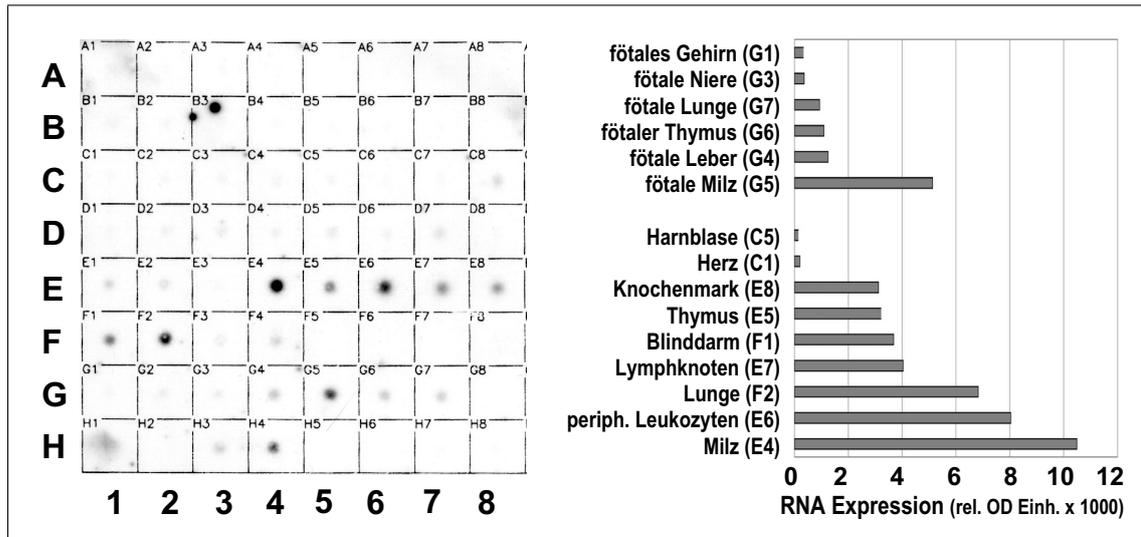


Abbildung 4.12: Dot-Blot mit 50 humanen mRNA-Proben (Clontech), hybridisiert mit spezifischer humaner *edg6*-cDNA (bp 438-842, EMBL-Datenbankeintrag AJ000479). A1: Gesamthirn; A2: Amygdala; A3: Caudatus Nucleus; A4: Cerebellum; A5: Cerebralcortex; A6: Frontallappen; A7: Hippocampus; A8: Medulla Oblongata; B1: Occipitallappen; B2: Putamen; B3: Substantia Nigra; B4: Temporallappen; B5: Thalamus; B6: Subthalamischer Nucleus; B7: Rückenmark; C1: Herz; C2: Aorta; C3: Skelettmuskel; C4: Dickdarm; C5: Harnblase; C6: Uterus; C7: Prostata; C8: Magen; D1: Hoden; D2: Ovarien; D3: Pancreas; D4: Hypophyse; D5: Nebenniere; D6: Schilddrüse; D7: Speicheldrüse; D8: Brustdrüse; E1: Niere; E2: Leber; E3: Dünndarm; E4: Milz; E5: Thymus; E6: periphere Leukozyten; E7: Lymphknoten; E8: Knochenmark; F1: Blinddarm; F2: Lunge; F3: Luftröhre; F4: Placenta; G1: fötales Gehirn; G2: fötales Herz; G3: fötale Niere; G4: fötale Leber; G5: fötale Milz; G6: fötaler Thymus; G7: fötale Lunge; H1: Hefe Gesamt-RNA; H2: Hefe tRNA; H3: E.coli rRNA; H4: E.coli DNA; H5: Poly r(A); H6: humane Cot1 DNA; H7: humane DNA; H8: humane DNA. Die Signale in B3 und H1 sind unspezifisch.

4.3.2 *edg6*-mRNA-Expression in humanen Geweben

Um eine genauere Aussage über die *edg6*-mRNA-Expression im nativen System zu erhalten und um ein breiteres Spektrum für die genauere Definition der Expressionsspezifität zu erfassen, wurde ein Dot-Blot mit mRNA-Proben aus 50 unterschiedlichen humanen Geweben (Clontech) mit einer spezifischen *edg6*-cDNA-Sonde (bp 438-842, EMBL-Datenbankeintrag AJ000479, Kap. 4.3.1) hybridisiert. Wie in Abb. 4.12 deutlich zu sehen ist, ist die *edg6*-mRNA-Expression auf Organe des hämatopoetischen und lymphatischen Systems sowie der Lunge beschränkt. Die höchste Expression findet man demnach in der fötalen und adulten Milz sowie in adulten peripheren Leukozyten und Lunge, gefolgt von einer schwächeren Expression in adulten Lymphknoten, Blinddarm, Thymus und Knochenmark. Eine schwache Expression ist in fötaler Leber, Thymus und Lunge nachweisbar.

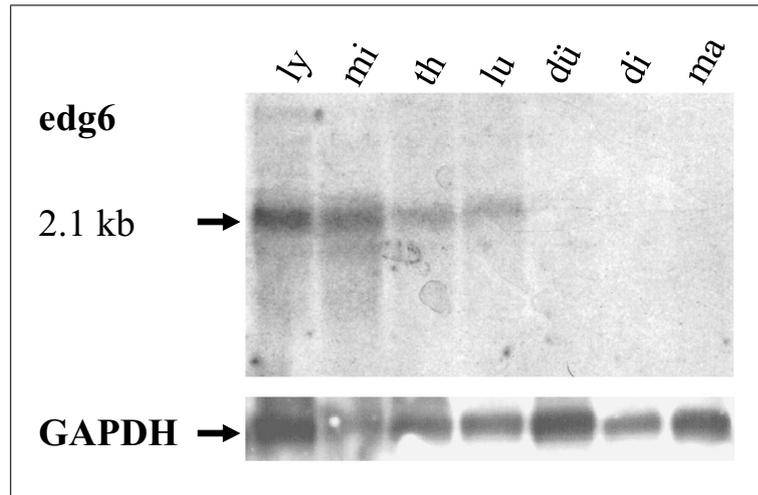


Abbildung 4.13: Northern-Blot mit Gesamt-RNA aus murinen Geweben, hybridisiert mit radioaktiv markierter muriner *edg6*-spezifischer cDNA. ly: Lymphknoten; mi: Milz; th: Thymus; lu: Lunge; dü: Dünndarm; di: Dickdarm; ma: Magen. Ferner konnte in den folgenden murinen Geweben kein Hybridisierungssignal festgestellt werden (nicht abgebildet): Herz, Leber, Niere, Skelettmuskel, Pancreas, Cerebellum, Cerebrum. Als Expressionskontrolle wurde ein radioaktiv markiertes cDNA-Fragment der humanen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase verwendet (GAPDH, EMBL-Datenbankeintrag M33197, bp 590-1037, Kap. 2.3).

4.3.3 *edg6*-mRNA-Expression in murinen Geweben

Der Nachweis des mRNA-Expressionsmusters in murinen Geweben wurde mit derselben Sonde durchgeführt, die bereits in Kap. 4.2 verwendet wurde (309 bp-Fragment, bp 1347-1655, Abb. 4.3).

Das Expressionsmuster der murinen *edg6*-mRNA entspricht dem des humanen Homologs, wobei die murine *edg6*-mRNA mit etwa 2,1kb um 0,4kb größer ist als das humane Homolog (Abb. 4.13). Der Northern-Blot zeigt eine *edg6*-mRNA-Expression in murinen Lymphknoten, Milz, Thymus und Lunge, während in allen anderen untersuchten Geweben keine *edg6*-mRNA nachweisbar war (Abb. 4.13).

4.4 Genomische Lokalisation

4.4.1 Genomische Lokalisation des humanen EDG6-Rezeptors

Bei einem Vergleich der humanen *edg6*-cDNA-Sequenz mit der EMBL-Datenbank ist aufgefallen, daß das 5'-Ende des EMBL-Datenbankeintrags X65642 mit dem 3'-Ende der humanen *edg6*-cDNA identisch ist. Der überlappende Bereich dieses Datenbankeintrags ist Teil des repetitiven Dinukleotid-Polymorphismus mit der Bezeichnung D19S120, der als Satellitensequenz auf Chro-

Nr.	EMBL-Datenbankeintrag	Größe (bp)	Datum
1	AC005262	44235	7/99
2	AC005264	39172	7/99
3	AC011547	44059	10/99
4	AC005331	35581	7/98
5	AC006505	36555	2/99

Während hinter dem 3'-Ende der für die *edg6*-mRNA kodierenden genomischen DNA keine weiteren bekannten Gene identifiziert werden konnten, ist etwa 15,3kb vor dem 5'-Ende der für die *edg6*-mRNA kodierenden genomischen DNA das *Gna16*-Gen lokalisiert, das für die humane $G_{\alpha 16}$ -Untereinheit trimärer G-Proteine kodiert. Vor dem *Gna16*-Gen befindet sich wiederum das *Gna11*-Gen in der gleichen Orientierung, das für die $G_{\alpha 11}$ -Untereinheit trimärer G-Proteine kodiert.

4.4.2 Genomische Lokalisation des murinen EDG6-Rezeptors

Der entscheidende Hinweis für die murine Chromosomenlokalisierung des *edg6*-Gens stammte von der Sequenzierung der flankierenden genomischen Sequenzen im Rahmen der Herstellung *edg6*-defizienter Mäuse (Kap. 4.2). Sequenzanalysen haben ergeben, daß das 5'-Ende des in Abb. 4.8 dargestellten *Pst*I-Fragments aus dem 5'-genomischen Bereich der *edg6*-flankierenden DNA mit dem 3'-Ende des 3'-nichttranslatierten Bereichs der *Gna15*-cDNA homolog ist (Abb. 4.15). Somit befindet sich im murinen Organismus das Gen für *edg6* etwa 2,6kb hinter dem Gen *Gna15*, das für das murine Homolog der humanen $G_{\alpha 16}$ -Untereinheit trimärer G-Proteine kodiert. Da das murine *Gna15*-Gen auf Maus-Chromosom 10 lokalisiert werden konnte (Davignon *et al.*, 1996), ist auch das murine *edg6*-Gen auf Maus-Chromosom 10 kodiert. Interessanterweise ist die Anordnung der Gene *Gna11*, *Gna15* und *edg6* im murinen Organismus die gleiche wie im humanen Organismus (Kap. 4.4.1).

5'-end	<u>CTGCAGGTCCAGGAGCTGCCAAGTGGGGAAGCCAGCCACAGGGAGAGAGTCCCTGCTTCCTA</u>	63
Gna15	CTGCAGGTCCAGGAGCTGCCAAGTGGGGAAGCCAGCCACAGG-AGAGAGTCCCTGCTTCCTA	448

Abbildung 4.15: Sequenzvergleich des 5'-Endes der sequenzierten murinen genomischen *edg6*-DNA nach *Pst*I-Restriktion (Abb. 4.8) mit dem 3'-nichttranslatierten Bereich der murinen *Gna15*-cDNA (EMBL-Datenbankeintrag U37419). Die *Pst*I-Schnittstelle ist unterstrichen.

	Epitop											Spacer						
HA-Epitop	M	G	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	G	G	P	14			
	ATGGGCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGTGGTCCC													42				
	Spacer						Epitop											
<i>myc</i> -Epitop	P	G	G	S	G	P	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L	L	17
	CCTGGAGGATCTGGGCCCAGCAGAAGCTGATATCTGAGGAAGATCTCCTC																	51

Abbildung 4.16: Protein- und Nukleinsäuresequenzen des N-terminalen Hämagglutinin-(HA)- sowie des C-terminalen *myc*-Epitops. Die Epitope sind durch Glycin- und Prolin-reiche Unterbrechungssequenzen (Spacer) von den EDG6-Sequenzen getrennt, um funktionelle Beeinträchtigungen aufgrund von gegenseitigen Wechselwirkungen beider Sequenzen möglichst zu unterbinden.

4.5 Proteinexpression Epitop-markierter EDG6-Rezeptoren

Um die Expression des EDG6-Rezeptors auch auf Proteinebene nachweisen zu können, wurden zwei unterschiedliche Konstrukte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt. Zum einen wurde am N-Terminus des EDG6-Rezeptors ein Hämagglutinin-(HA)-Epitop, zum anderen am C-Terminus ein *myc*-Epitop angehängt (Abb. 4.16). Das *myc*-Epitop wurde mit Hilfe der Primer HinEDG und RückEDG (Kap. 2.7) mit *edg6*-Vollängen-cDNA in pZerO-2 (Kap. 2.3) als Template-DNA amplifiziert (Kap. 3.10.2), mit *Bgl*III (A/GATCT) und *Hin*DIII (A/AGCTT) geschnitten (Kap. 3.17.1) und in den mit *Hin*DIII und unvollständig *Bgl*III (60min, 0,1U/ μ g DNA) geschnittenen pRC/CMV-Vektor inkloniert, der zuvor bereits den mit *Hin*DIII und *Xba*I (T/CTAGA) inklonierten C-terminal *myc*-Epitop-markierten Interleukin-8-Rezeptor A enthielt (Emrich *et al.*, 1993). Das HA-Epitop wurde mit den Primern hEDG6HA und hHISC2 (Kap. 2.7) mit *edg6*-Vollängen-DNA in pZerO-2 (Kap. 2.3) als Template-DNA amplifiziert, mit *Ppu*MI (RG/GWCCY) und *Hin*DIII (A/AGCTT) geschnitten und in den mit *Hin*DIII und *Ppu*MI geschnittenen pRC/CMV-Vektor inkloniert, in dem zuvor bereits der humane *edg6*-cDNA Vollängenklon mit *Hin*DIII und *Xba*I aus dem pZerO-2-Vektor umkloniert worden war. Ein sowohl N-terminal HA-, als auch C-terminal *myc*-Epitop-markierter humaner EDG6-Rezeptor wurde durch Restriktion der HA- und *myc*-Epitop-markierten Konstrukte mit *Hin*DIII und *Ppu*MI und anschließendem Einklonieren des aus dem HA-Epitop-markierten Konstrukts herausgeschnittenen Fragments in das *myc*-Epitop-markierte Konstrukt hergestellt. Die Vektorkonstrukte wurden in HEK293-Zellen transient transfiziert (Kap. 3.4.1) und mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert (Kap. 3.20). Dazu wurden spezifische anti-*myc*-Epitop Antikörper (9E10) und anti-HA-Epitop Antikörper (3F10) verwendet. Das Ergebnis ist in Abb. 4.17 dargestellt. Man sieht deutlich, daß das C-terminale *myc*-Epitop nur in permeabilisierten Zellen detektiert wird, während das N-terminale HA-Epitop auch auf der Oberfläche von dem spezifi-

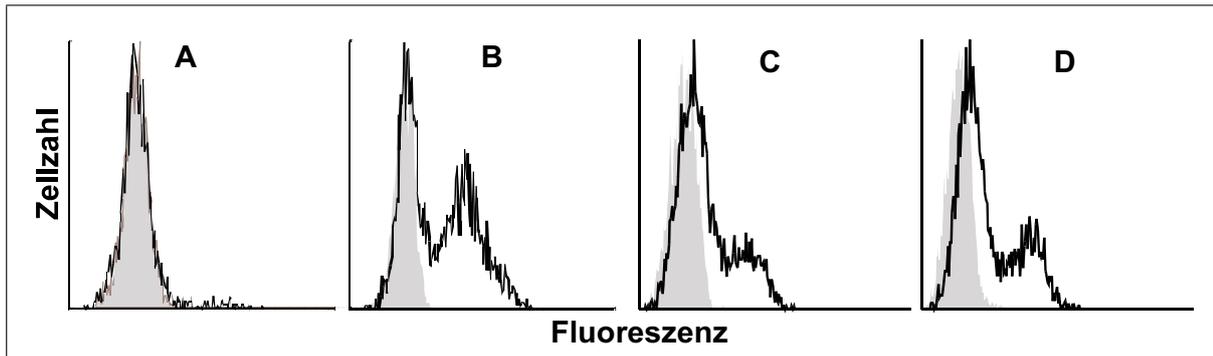


Abbildung 4.17: FACS-Analysen der N-terminal HA- (C,D) und C-terminal *myc*-Epitop-markierten (A,B) humanen EDG6-Rezeptoren auf der Oberfläche (A,C) und in permeabilisierten (B,D) transient transfizierten HEK293-Zellen.

schen anti-HA Antikörper erkannt wird. Damit ist gezeigt, daß der EDG6-Rezeptor zum einen auf der Zelloberfläche exprimiert wird, und zum anderen in der korrekten Orientierung in die Zellmembran integriert wird, da der N-Terminus auch auf der Zelloberfläche erkannt wird, während der C-Terminus lediglich in permeabilisierten Zellen für den spezifischen anti-*myc*-Epitop Antikörper zugänglich ist und sich damit im Zellinneren befindet.

4.6 Herstellung monoklonaler Antikörper

Um den EDG6-Rezeptor auch ohne zusätzliche Epitop-Markierung in primären Zellen und Geweben nachweisen zu können, wurde in Kollaboration mit Dr. Elisabeth Kremmer vom GSF-München versucht, monoklonale Antikörper sowohl gegen den humanen, als auch gegen den murinen EDG6-Rezeptor herzustellen. Zu diesem Zweck sind neben rekombinanten Proteinen mit den N-Termini des humanen und des murinen EDG6-Rezeptors auch humanen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor überexprimierende RBL-Rattenzellen hergestellt worden.

4.6.1 Generierung rekombinanter Proteine

Die Immunisierung mit rekombinanten Proteinen bietet den Vorteil, daß positive Antikörper sehr einfach über einen ELISA-Test vorselektioniert werden können.

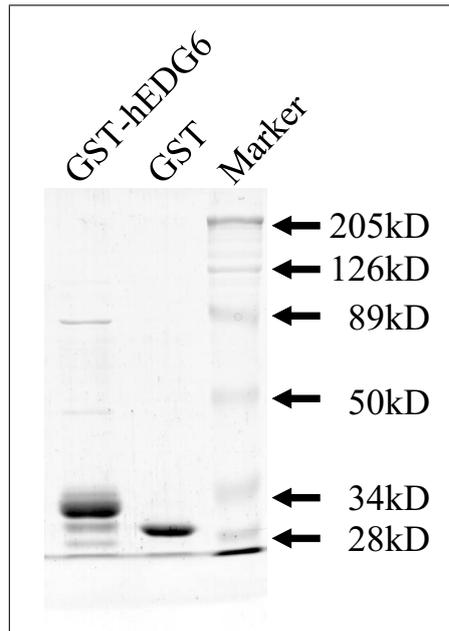


Abbildung 4.18: Coomassie-Färbung eines 10% SDS-Glycingels (Kap. 3.6.1, 3.7.1). Aufgetragen ist neben einem Proteinmarker das GST-Protein (26kD) sowie das GST-Fusionsprotein mit dem C-terminal angehängten N-Terminus (aa 1-57) des humanen EDG6-Rezeptors.

Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein des humanen EDG6-N-Terminus

Um monoklonale Antikörper gegen den humanen EDG6-Rezeptor zu erhalten, wurde ein Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsprotein mit dem N-Terminus des humanen EDG6-Rezeptors (aa 1-57, bp 12-196) hergestellt (Smith und Johnson, 1988). Dazu wurde das Fragment des mit *Sma*I (CCC/GGG) und *Xcm*I (CCANNNNN/NNNNTGG) geschnittenen humanen *edg6*-Vollängenklons (Kap. 3.17.1) in den mit *Eco*RI (G/AATCC) linearisierten und mit T4-Polymerase geglätteten pGEX-2T-Vektor inkloniert (Kap. 3.17.3, 3.18). In diesem Vektorsystem ist das GST-Protein N-terminal am inklonierten Protein angehängt. Der Leserahmen wurde durch Sequenzierung (Kap. 3.19) mit den Primern Gex-3' und Gex-5' (Kap. 2.7) kontrolliert. Anschließend ist das Fusionsprotein in *E. coli* TOP10F'-Zellen exprimiert und aufgereinigt worden (Kap. 3.3). Wie in Abb. 4.18 deutlich zu sehen ist, ist das exprimierte Fusionsprotein um etwa 6kD größer als der reine GST-Anteil, der etwa 26kD groß ist.

Hexahistidin-Fusionsprotein des murinen EDG6-N-Terminus

Neben GST-Fusionsproteinen wurden vor allem für die Herstellung von Antikörpern gegen den murinen EDG6-Rezeptor auch Hexahistidin-markierte Proteine hergestellt. Diese Methode hat mehrere Vorteile: Zum einen befindet sich der Hexahistidin-Anteil am C-Terminus des Fusions-

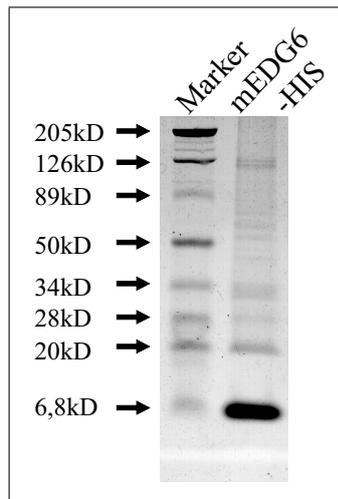


Abbildung 4.19: Coomassie-Färbung eines 12% SDS-Tricingels (Kap. 3.6.2, 3.7.1). Aufgetragen ist neben einem Proteinmarker der C-terminal Hexahistidin-markierte N-Terminus (aa 1-56) des murinen EDG6-Rezeptors.

proteins, wodurch der N-Terminus des EDG6-Rezeptors frei bleibt, was auch im nativen System der Fall ist. Desweiteren werden lediglich 6 Aminosäuren angehängt, so daß die Immunogenität des Fusionsanteils deutlich geringer ist als beispielsweise bei dem 26kD großen GST-Protein. Und die Hexahistidin-markierten Proteine lassen sich ebenfalls sehr effizient aufreinigen und mit spezifischen anti-Hexahistidin Antikörpern nachweisen (Kap. 3.3.3).

Es wurden Vektorkonstrukte mit den N-Termini des humanen und des murinen Rezeptors hergestellt. Dazu wurden PCR-Reaktionen mit „CombiPol“ DNA-Polymerase (InViTek) und den jeweiligen Vollängen-Plasmiden als Template-DNA sowie den Primern hHISC1, hHISC2 (aa 2-53, bp 26-181 des humanen EDG6 Rezeptors) und mHISC1, mHISC2 (aa 2-56, bp 503-667 des murinen EDG6-Rezeptors) durchgeführt (Kap. 3.10.2). Die „CombiPol“ DNA-Polymerase wurde verwendet, weil sie Amplifikate mit glatten DNA-Enden produziert. Die Produkte dieser PCR-Reaktionen wurden mit *Bgl*II (A/GATCT) geschnitten (Kap. 3.17.1) und in den nach *Nco*I (C/CATGG) -Restriktion mit T4-Polymerase geglätteten (Kap. 3.17.3) und schließlich mit *Bgl*II geschnittenen pQE60-Vektor kloniert (Kap. 3.18), der eine Hexahistidin-Sequenz am 3'-Ende der multiplen Klonierungsstelle besitzt (Kap. 2.3). Die Vektorkonstrukte wurden mit den Primern pQEfor und pQErev sequenziert (Kap. 2.7, 3.19). Für eine effiziente Proteinexpression wurden die Plasmide vom ursprünglichen *E. coli*-Stamm TOP10F' in die *E. coli*-Stämme SG13009[pREP4] und M15[pREP4] transformiert, die beide ein zusätzliches pREP4-Plasmid enthalten (Qiagen), das für eine konstitutive Expression des vom *lac*I-Gen kodierten *lac*-Repressor-Proteins sorgt (Kap. 2.1).

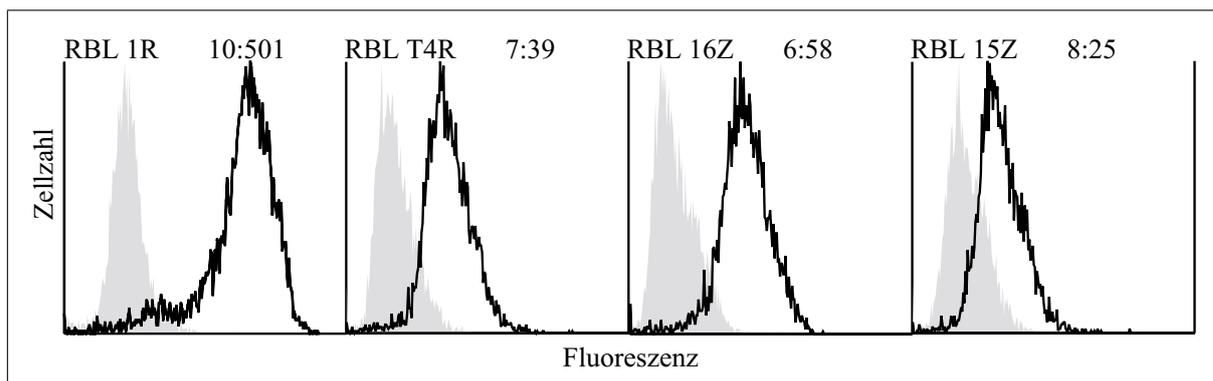


Abbildung 4.20: FACS-Analysen der mit humanem C-terminal *myc*-Epitop-markiertem EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) stabil transfizierten RBL-Rattenzellen. Die Zahlen geben das Verhältnis der Expression des humanen EDG6-*myc* zwischen der nichttransfizierten RBL-Negativkontrolle und des jeweiligen RBL-Klons an (lineares Mittel der Fluoreszenz). Sämtliche Zellen sind zur Detektion des intrazellulären *myc*-Epitops permeabilisiert worden (Kap. 3.20.1).

Während die Expression des C-terminal Hexahistidin-markierten humanen EDG6-N-Terminus in keinem der erwähnten bakteriellen *E. coli*-Stämme gelang, konnte der C-terminal Hexahistidin-markierte murine EDG6-N-Terminus am effizientesten im *E. coli*-Stamm SG13009[pREP4] exprimiert werden. Die Aufreinigung des Produkts gelang lediglich unter denaturierenden Bedingungen, da unter nativen Bedingungen das Hexahistidin-markierte Protein keine Affinität zur Ni-NTA-Agarose zeigte (Kap. 3.3.3). Abb. 4.19 zeigt das aufgereinigte Produkt, das eine Größe von etwa 7,5kD hat.

4.6.2 Generierung stabil EDG6 überexprimierender Rattenzelllinien

Eine weitere Möglichkeit für die Herstellung monoklonaler Antikörper ist die Immunisierung mit ganzen Zellen der gleichen Spezies (bei Immunisierung von Ratten also Rattenzellen), die das Protein, gegen das der Antikörper gerichtet sein soll, auf der Oberfläche exprimieren. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß dem Antikörper-bildenden Organismus der gesamte nativ gefaltete Rezeptor präsentiert wird, wodurch sich die Zahl möglicher Epitope erhöht und neben Sequenzepitopen auch Strukturepitope erkannt werden, und zudem posttranslationale Modifikationen bei der Antikörpererkennung berücksichtigt werden. Der Nachteil hingegen liegt in der sehr viel aufwendigeren Selektion positiver Klone, da ein einfacher ELISA-Test mit dem vollständigen nativen Rezeptor nicht durchführbar ist.

Für die Immunisierung von Ratten wurden stabil humanen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) überexprimierende RBL-Rattenzellen hergestellt und

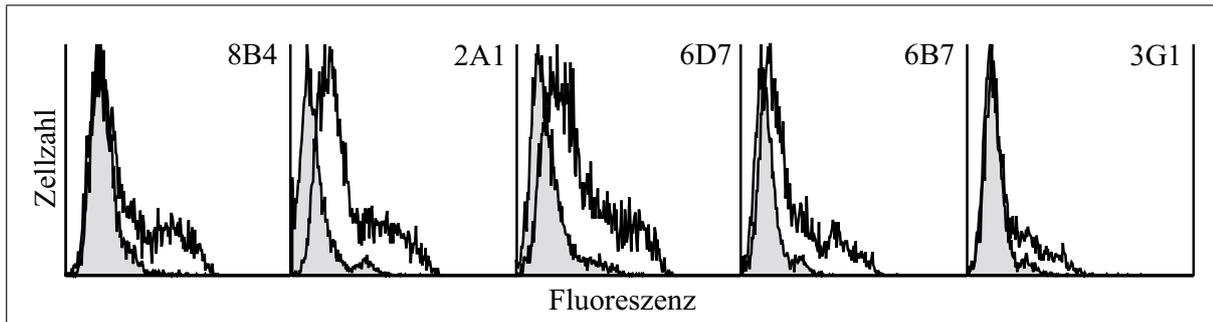


Abbildung 4.21: FACS-Analysen von transient mit murinem C-terminal *myc*-Epitop-markiertem EDG6-Rezeptor transfizierten HeLa-Zellen mit den fünf positiven Hybridomüberständen gegen den murinen EDG6-Rezeptor. Die mit C-terminal *myc*-Epitop-markierten Interleukin-8-Rezeptor A transfizierten Kontrollen sind grau unterlegt. Die Hybridome, die die ersten drei Zellkulturüberstände produziert haben, konnten auskloniert werden (8B4, 2A1 und 6D7).

mit Hilfe der Durchflußzytometrie und dem spezifischen anti-*myc*-Epitop Antikörper 9E10 analysiert (Kap. 3.4.2, 3.20). Wie in Abb. 4.20 zu sehen ist, konnten drei stark überexprimierende Klone (RBL T4R, RBL 16Z und RBL 1R) sowie ein schwach überexprimierender Klon (RBL 15Z) isoliert werden. Die „R“-Klone wurden mit humanem EDG6-*myc* in dem Vektor pRC/CMV (Kap. 4.5), die „Z“-Klone mit humanem EDG6-*myc* in dem Vektor pZeoSV2(+) hergestellt (Kap. 2.3), wobei das humane *edg6-myc*-Fragment mit *HinDIII* (A/AGCTT) und *XbaI* (T/CTAGA) ausgeschnitten (Kap. 3.17.1), die *XbaI*-Schnittstelle mit T4-Polymerase geglättet (Kap. 3.17.3) und das Fragment anschließend in den mit *HinDIII* und *EcoRV* (GAT/ATC) geschnittenen pZeoSV2(+)-Vektor ligiert wurde (Kap. 3.18.1). Der RBL 1R-Klon wurde für die Immunisierung von Ratten ausgewählt.

4.6.3 Fusion, Subklonierung und Selektion von Hybridomzellen

Die Immunisierung von Ratten sowie die Herstellung und Vorselektion von Hybridomzellen erfolgte im Labor von Dr. Elisabeth Kremmer am GSF-München.

Die Verwendung von rekombinanten Proteinen für die Immunisierung hatte den Vorteil, daß das Fusionsprotein mit seinem Fusionsanteil im sogenannten „Sandwich“-ELISA Verfahren an den Boden einer 96-Lochplatte gebunden werden konnte und die negativen Antikörper, die nicht an das rekombinante Protein binden, ausselektiert werden konnten. Diese Vorselektion wurde bereits im Labor von Dr. Elisabeth Kremmer am GSF-München durchgeführt. Die restlichen positiven Klone wurden anschließend mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Kap. 3.20) auf transient EDG6-*myc* transfizierten Zellen (Kap. 4.5) getestet.

Aus insgesamt vier Fusionen mit dem GST-Fusionsprotein, das den C-terminal angehängten N-Terminus (aa 1-57) des humanen EDG6-Rezeptors enthielt (Kap. 4.6.1) sind 15 Hybridomüberstände hervorgegangen, die nach der Vorselektion durch einen ELISA-Test positiv waren. Allerdings zeigte keiner dieser Überstände ein positives Signal in der FACS-Analyse oder in der Western-Blot Analyse mit humanen-EDG6-*myc*-überexprimierenden Zellen. Die Immunisierung mit humanen-EDG6-*myc*-überexprimierenden RBL-Rattenzellen (Kap. 4.6.2) wurde aufgrund der damit verbundenen aufwendigen Selektion positiver Hybridomüberstände nicht durchgeführt, so daß kein monoklonaler Antikörper gegen den humanen EDG6-Rezeptor hergestellt werden konnte.

Aus einer Fusion mit dem C-terminal Hexahistidin-markierten murinen EDG6-N-Terminus (aa 1-56, Kap. 4.6.1) sind 34 Hybridomüberstände hervorgegangen, die nach der Vorselektion durch einen ELISA-Test positiv waren. Fünf dieser Hybridomüberstände waren auch in der FACS-Analyse mit murinen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor überexprimierenden Zellen positiv (Abb. 4.21). Für diesen Test wurde der murine *edg6*-Vollängerklon mit *Sma*I (CCC/GGG) und unvollständig (30min, 0,5U/ μ g DNA) mit *Apa*I (GGGCC/C) aus dem pZerO-2-Vektor geschnitten (Kap. 3.17.1) und in den mit *Hin*DIII (A/AGCTT) geschnittenen, anschließend mit T4-Polymerase geglätteten (Kap. 3.17.3) und unvollständig (1h, 0,5U/ μ g DNA) mit *Apa*I nachgeschnittenen pRC/CMV-Vektor inklusive des humanen EDG6-*myc*, das bei dieser Prozedur bis auf einen 3'-Rest der *myc*-Epitop-Sequenz deletiert wurde, kloniert (Kap. 3.18). Dadurch wurde ein Expressionssystem in Säugetierzellen für den murinen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor geschaffen. Drei dieser fünf Antikörper produzierenden Hybridome konnten kloniert werden (Abb. 4.22). Die von ihnen produzierten monoklonalen Antikörper werden in den folgenden Abschnitten charakterisiert.

4.7 Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen murinen EDG6-Rezeptor

Die drei monoklonalen Antikörper, die gegen den murinen EDG6-Rezeptor gerichtet sind, wurden in transienten Überexpressionssystemen und auf primären Zellen in der Durchflußzytometrie sowie mit der Western-Blot-Methode charakterisiert, um deren Spezifität und Verwendbarkeit zu testen. Der Immunglobulin-Subtyp aller drei Antikörper ist IgG 2A κ . Die Bestimmung wurde im Labor von Dr. Elisabeth Kremmer am GSF-München durchgeführt.

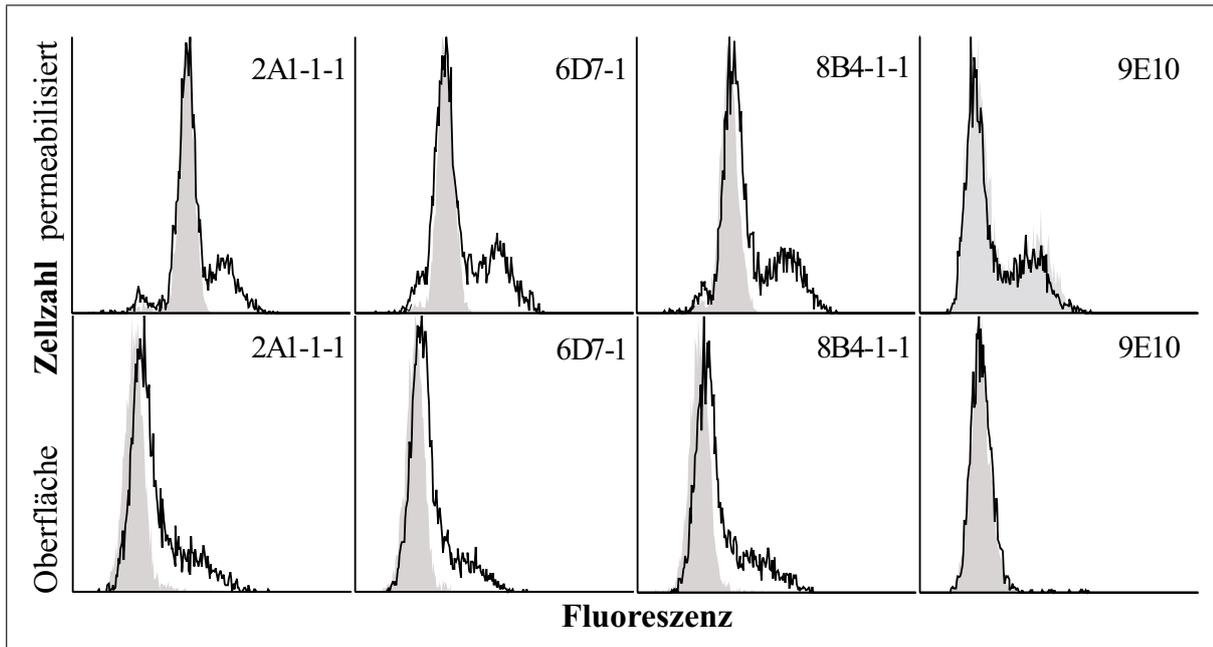


Abbildung 4.22: FACS-Analysen von transient mit murinem C-terminal *myc*-Epitop-markiertem EDG6-Rezeptor transfizierten HeLa-Zellen mit den drei monoklonalen Antikörpern gegen den murinen EDG6-Rezeptor. Die mit humanem N-terminal Hämagglutinin-Epitop und C-terminal *myc*-Epitop-markiertem EDG6-Rezeptor transfizierten Kontrollen sind grau unterlegt (Kap. 4.5). Der 9E10-Antikörper erkennt das C-terminale *myc*-Epitop in permeabilisierten Zellen, nicht jedoch auf der Zelloberfläche.

4.7.1 FACS-Analysen überexprimierender Zelllinien

FACS-Analysen mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem murinem EDG6-Rezeptor

Zunächst wurden die drei monoklonalen Antikörper, die gegen den murinen EDG6-Rezeptor gerichtet sind, auf transient mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem murinem EDG6-Rezeptor transfizierten HeLa-Zellen getestet (Kap. 4.6.3). Dabei stellte sich heraus, daß alle drei Antikörper in der Lage sind, den murinen Rezeptor im Überexpressionssystem zu erkennen (Abb. 4.22). Eine Kreuzreaktion mit dem humanen EDG6-Rezeptor konnte dabei nicht festgestellt werden. Die Erkennung findet sowohl auf der Oberfläche, als auch in permeabilisierten Zellen statt.

FACS-Analysen mit N-terminal Hämagglutinin-Epitop-markiertem murinem EDG6-Rezeptor

Für diesen Versuch wurde der pRC/CMV-Vektor mit dem einklonierten N-terminal Hämagglutinin-(HA)-Epitop-markierten humanen EDG6-Rezeptor (Kap. 4.5) mit *PpuMI*

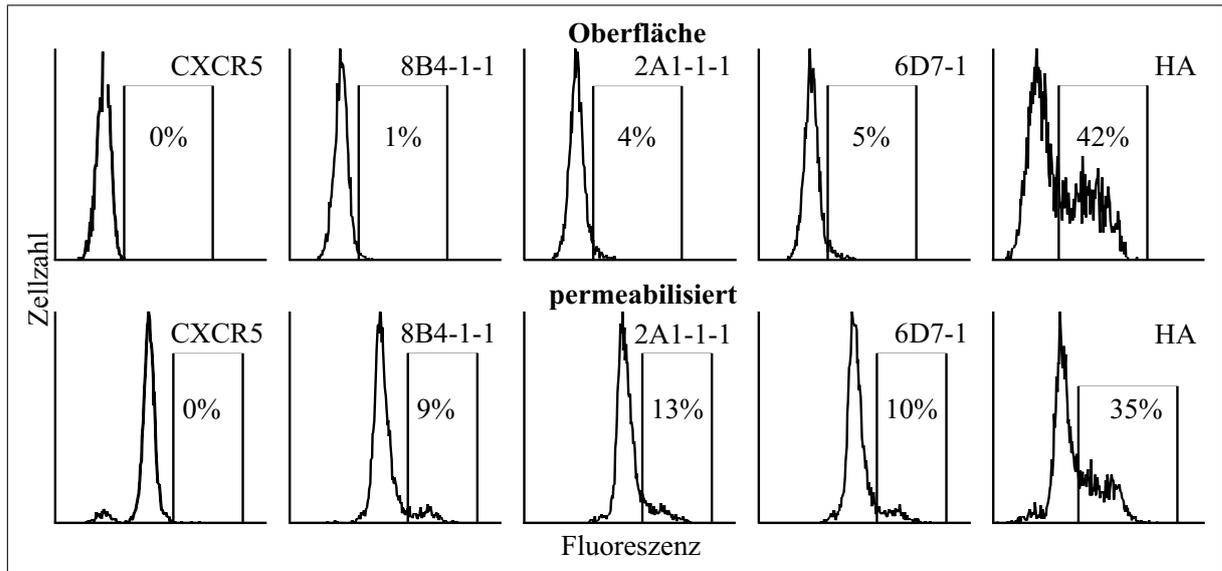


Abbildung 4.23: FACS-Analysen von transient mit murinem N-terminal Hämagglutinin-(HA)-Epitop-markiertem EDG6-Rezeptor transfizierten HeLa-Zellen mit den drei monoklonalen Antikörpern gegen den murinen EDG6-Rezeptor. Als Negativkontrolle ist der anti-murinen-CXC-Rezeptor 5 (CXCR5) Antikörper 2G8-2, als Positivkontrolle der anti-HA-Epitop (HA) Antikörper 3F10 angegeben.

(RGG/WCCY) geschnitten, mit T4-Polymerase geglättet und mit *ApaI* (GGGCC/C) nachgeschnitten (Kap. 3.17.1, 3.17.3). Der murine EDG6-Vollängenklon in dem pZerO-2-Vektor (Abb. 4.3) wurde mit *SmaI* (CCC/GGG) und unvollständig mit *ApaI* (20min, 1U/ μ g DNA) geschnitten (bp 489-1674, Abb. 4.3) und in den zuvor zurechtgeschnittenen pRC/CMV-Vektor kloniert (Kap. 3.18). Mit dem so erhaltenen N-terminal HA-Epitop-markierten murinen EDG6-Rezeptor (HA-EDG6) in dem pRC/CMV-Vektor wurden HeLa-Zellen transient transfiziert und die drei monoklonalen Antikörper getestet. Wie in Abb. 4.23 zu sehen ist, binden alle drei Hybridomüberstände 8B4-1-1, 2A1-1-1 und 6D7-1 im Vergleich zum anti-HA-Epitop Antikörper 3F10 nur schwach auf transient murinen HA-EDG6-Rezeptor transfizierten permeabilisierten HeLa-Zellen und kaum auf der Zelloberfläche. Offensichtlich wird das Epitop der drei klonierten anti-murinen-EDG6-Rezeptor Antikörper durch das N-terminal angehängte HA-Epitop blockiert (Abb. 4.23).

4.7.2 FACS-Analysen muriner Zelllinien

Um festzustellen, ob die Antikörper auch in der Lage sind, den endogen exprimierten murinen EDG6-Rezeptor zu erkennen, wurden zunächst FACS-Analysen mit der Zelllinie 18BE10 (Elbe et al, 1994) durchgeführt, da die murine *edg6*-cDNA aus diesen Zellen mit Hilfe der RACE-

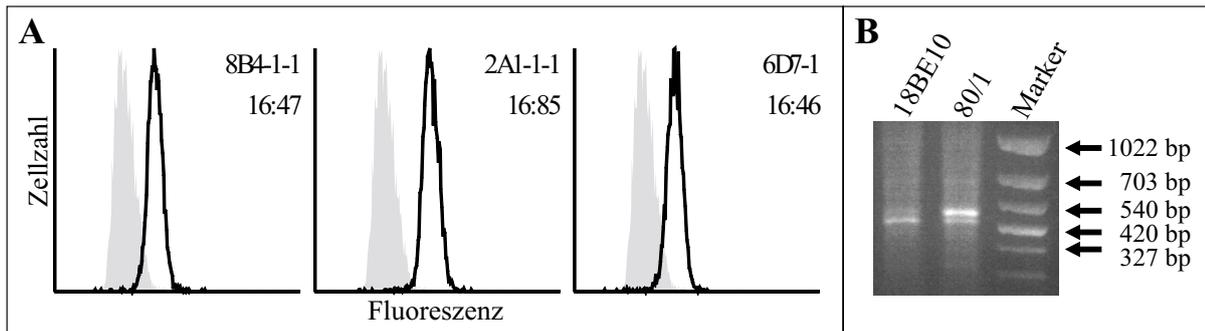


Abbildung 4.24: (A) FACS-Analysen von permeabilisierten 80/1-Zellen mit den drei monoklonalen Antikörpern gegen den murinen EDG6-Rezeptor. Die Zahlen geben das Verhältnis des linearen Mittels der Fluoreszenz zwischen der Isotypkontrolle (grau unterlegt) und den jeweiligen Antikörpern gegen den murinen EDG6-Rezeptor an. (B) PCR zur Amplifizierung eines 465 bp großen murinen *edg6*-Fragments aus 18BE10 und 80/1-Zellen.

PCR (Kap. 4.1.2) isoliert werden konnte. Zudem wurden weitere Analysen mit der verwandten Zelllinie 80/1 (Elbe *et al.*, 1994) sowie der murinen Makrophagenzelllinie J774A.1 durchgeführt. Während bei allen drei Zelllinien mit den drei Antikörpern 8B4-1-1, 2A1-1-1 und 6D7-1 kein EDG6-Rezeptor auf der Zelloberfläche nachweisbar war, konnte nach Permeabilisierung mit allen drei Antikörpern ein deutliches Signal in 80/1-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.24A). Allerdings blieb bei 18BE10 und J774A.1-Zellen auch nach Permeabilisierung sowie nach Stimulierung mit 10ng/ml PMA für 1h ein Signal aus.

Um festzustellen ob das ausbleibende FACS-Signal in der 18BE10-Zelllinie möglicherweise an der fehlenden Expression des EDG6-Rezeptors liegt, wurde eine PCR auf cDNA der 18BE10 und der 80/1-Zellen mit den Primern GSP2 und 3-Primer durchgeführt (Kap. 3.10.2, 2.7, PCR-Bedingungen: (1) 94°C, 2min; (2) 94°C, 1min; (3) 50°C, 1min; (4) 72°C, 1,5min; 35 Zyklen (2-4), (5) 72°C, 5min). Aus der cDNA beider Zelllinien konnte ein 465 bp großes *edg6*-Fragment (bp 1216-1680, Abb. 4.3) amplifiziert werden, wobei das entsprechende Signal der 80/1-Zelllinie stärker ausfiel (Abb. 4.24B). Die Amplifizierung eines kleineren zweiten PCR-Produkts ist vermutlich auf eine gewisse Unspezifität der PCR-Reaktion zurückzuführen.

4.7.3 FACS-Analysen primärer muriner Milzzellen

Die Expression von EDG6 wurde mit Hilfe der drei monoklonalen Antikörper auch auf murinen Milzzellen getestet, da nach Abb. 4.13 *edg6* in der Milz transkribiert wird. Wie in Abb. 4.25 zu sehen ist, hat keiner der drei Antikörper ein EDG6-spezifisches Signal gezeigt. Lediglich der Antikörper gegen den CXCR5-Chemokinrezeptor, der auf B-Zellen exprimiert ist und als Positivkontrolle verwendet wurde, hat ein deutliches Signal geliefert. Anschließend Experimente

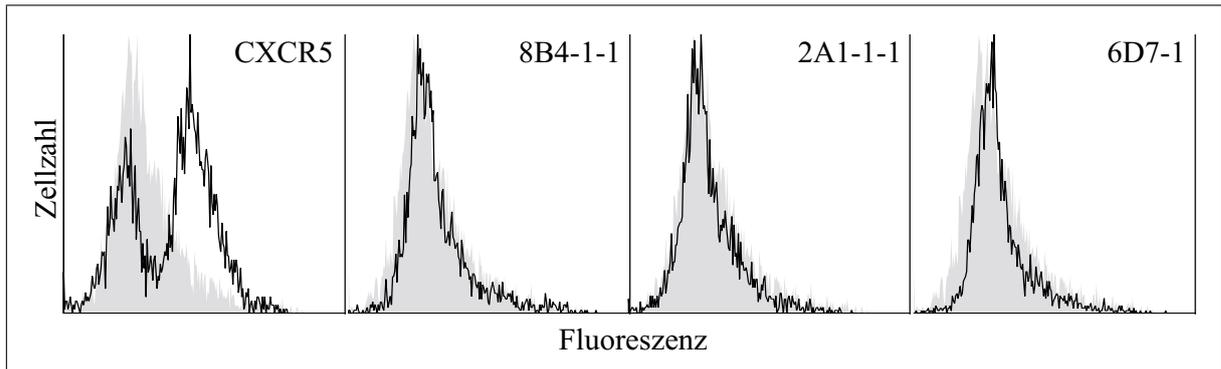


Abbildung 4.25: FACS-Analysen von der Oberfläche primärer muriner Milzzellen mit den drei monoklonalen Antikörpern gegen den murinen EDG6-Rezeptor. Die Isotyp-Kontrolle ist grau unterlegt, die jeweiligen Antikörper gegen den murinen EDG6-Rezeptor sind durch einen Antikörper gegen den murinen CXCR-Rezeptor 5 (CXCR5) als Positivkontrolle ergänzt, der auf B-Zellen exprimiert wird.

haben gezeigt, daß auch nach Permeabilisierung sowie nach zusätzlicher Stimulierung der Milzzellen für 15min bis 4h mit den Zellmitogenen Concanavalin A ($2\mu\text{g/ml}$), Lipopolysaccharide ($10\mu\text{g/ml}$) und PMA (10ng/ml) kein spezifisches EDG6-Signal gefunden wurde.

4.7.4 Western-Blots überexprimierender Zelllinien

Um die Funktion der drei ausklonierten Antikörper gegen den murinen EDG6-Rezeptor auch im Western-Blot zu testen, wurden Membranprotein-Extrakte aus transient mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem murinem EDG6-Rezeptor transfizierten und als Kontrolle aus transient mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem Interleukin-8 Rezeptor A (IL-8RA) transfizierten HEK293-Zellen untersucht (Kap. 3.4.3). Dabei zeigte sich, daß alle drei Antikörper in der Lage sind, den murinen EDG6-Rezeptor in transient transfizierten Zellen spezifisch nachzuweisen, während in IL-8RA-transfizierten Zellen kein Signal detektiert werden konnte (Abb. 4.26). Etwa bei der theoretischen Größe von 42kD sowie 3 bis 4kD darüber erscheinen bei EDG6-transfizierten Zellen zwei Banden. Die entsprechende Bande des Maus-anti-*myc*-Epitop Antikörpers 9E10 ist sowohl bei den EDG6, als auch bei den IL-8RA-transfizierten Zellen nicht zu erkennen, da der Sekundärantikörper gegen Ratte und nicht gegen Maus gerichtet war. Allerdings scheint der EDG6-Rezeptor trotz des fehlenden Aufkochens während der Probenvorbereitung (Kap. 3.6) nur partiell in das Gel eingewandert zu sein, da ein deutliches Signal auch am oberen Ende des Blots zu sehen ist.

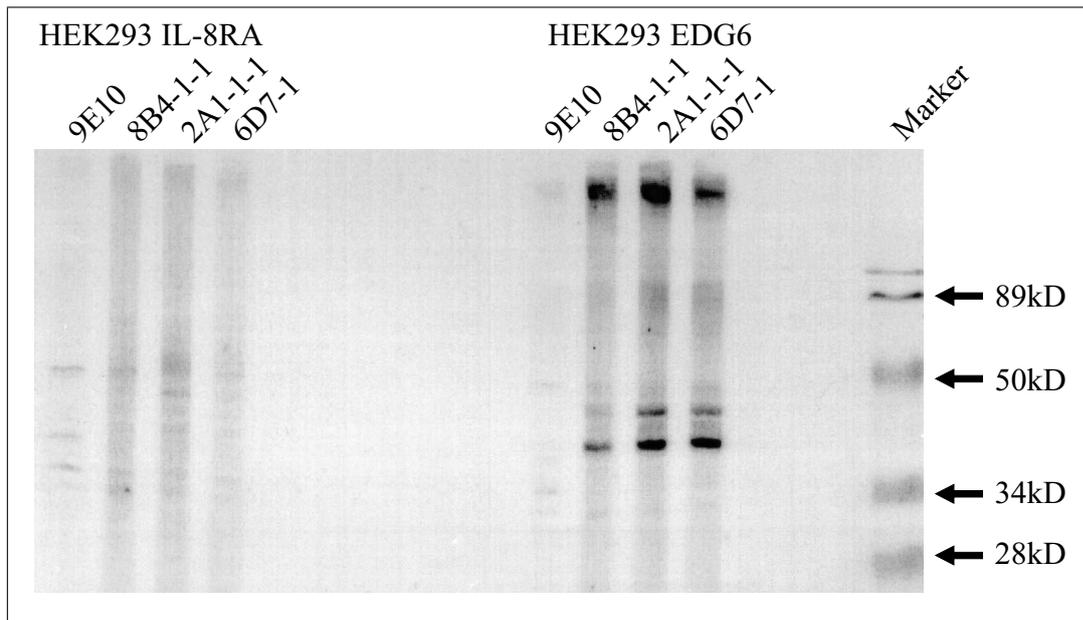


Abbildung 4.26: Western-Blot der drei monoklonalen Antikörper gegen den murinen EDG6-Rezeptor mit Membranprotein-Extrakten aus transient mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem Interleukin-8 Rezeptor A (IL-8RA) transfizierten sowie transient mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem murinem EDG6-Rezeptor (EDG6) transfizierten HEK293-Zellen. Der Maus-anti-*myc*-Epitop Antikörper 9E10 wird vom sekundären anti-Ratte Antikörper nicht detektiert.

4.7.5 Western-Blots primärer muriner Gewebeproteine

Um festzustellen, ob sich auch in Membranprotein-Extrakten primärer muriner Gewebe (Kap. 3.4.3) ein spezifisches Signal im Western-Blot ausmachen läßt, wurden diverse Glycin- und Harnstoffgele mit den entsprechenden Proteinextrakten beladen und auf Membranen übertragen (Kap. 3.6, 3.8.1). Allerdings konnten außer bei der transient murinen-EDG6-Rezeptor-transfizierten Positivkontrolle keine spezifischen Signale in den murinen Membranpräparationen detektiert werden (Abb. 4.27). Die Versuche wurden mit allen drei Antikörpern wiederholt, wobei auch die Konzentrationen der Antikörper sowie die der aufgetragenen Proteine variiert wurden. Neben reinen Glycingelen wurden auch Harnstoffgele eingesetzt. Auch Western-Blots mit der murinen dendritischen Zelllinie 80/1, die nach Permeabilisierung ein Signal in der FACS-Analyse gezeigt hat (Abb. 4.24A), blieben erfolglos.

4.8 Identifizierung des Liganden für EDG6

Eine wesentliche Voraussetzung für die funktionelle Charakterisierung des EDG6-Rezeptors ist die Kenntnis des spezifischen Liganden, durch dessen Bindung der Rezeptor aktiviert wird. Die

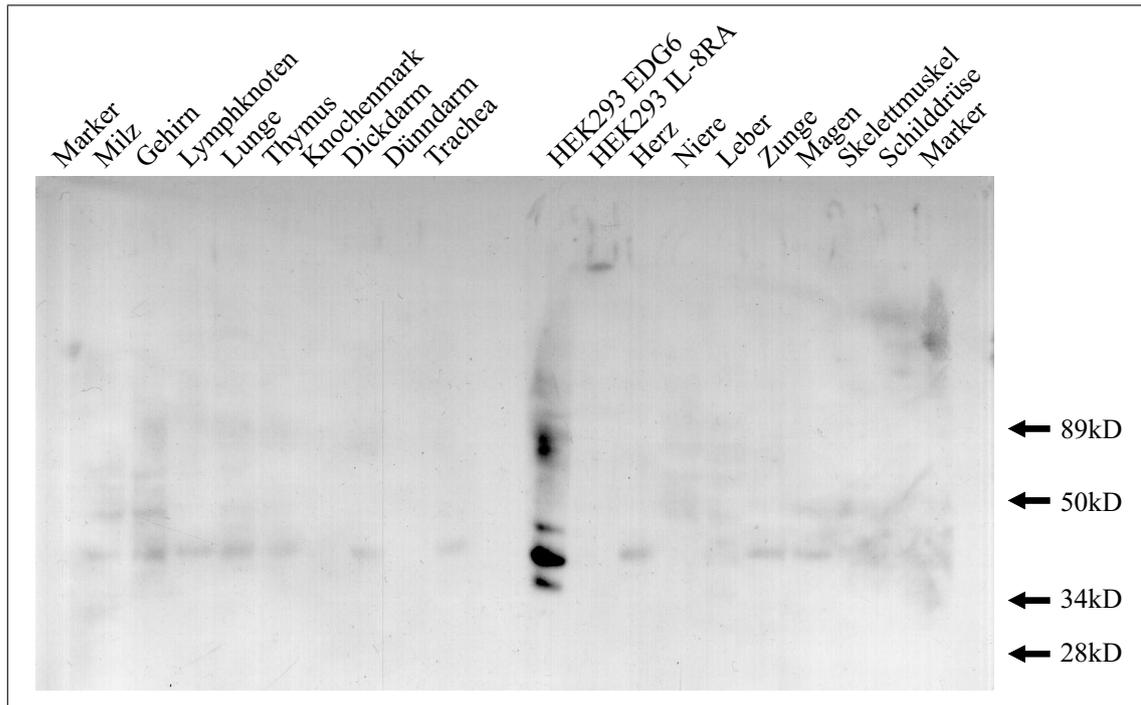


Abbildung 4.27: Western-Blot des Antikörpers 2A1-1-1 gegen den murinen EDG6-Rezeptor mit Membranprotein-Extrakten aus verschiedenen murinen Geweben sowie aus transient mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem murinem EDG6-Rezeptor (EDG6) transfizierten und transient mit C-terminal *myc*-Epitop-markiertem Interleukin-8 Rezeptor A (IL-8RA) transfizierten HEK293-Zellen als Kontrollen. Der Western-Blot (Kap. 3.8.1) wurde mit Hilfe des Chemolumineszenz-Nachweises analysiert (Kap. 3.8.2).

Identifizierung des Liganden fand in Zusammenarbeit mit Dr. Sarah Spiegel von der GUMC-Washington statt. Den Ausgangspunkt der Untersuchungen bildeten die Liganden anderer Mitglieder der EDG-Rezeptorfamilie, die ausnahmslos der Gruppe der Lysophospho- und Lysosphingolipide wie Lysophosphatidylsäure (LPA) und Sphingosin-1-phosphat (S1P) angehören. Aufgrund der Verwandtschaft der Rezeptoren untereinander war dies ein erster Hinweis dafür, daß möglicherweise auch der Ligand von EDG6 in der Gruppe der Lysophospho- und Lysosphingolipide zu finden ist.

4.8.1 Herstellung stabil überexprimierender HEK293 und CHO-K1-Zellen

Für den radioaktiven Bindungsassay wurden stabil und transient humanen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor überexprimierende HEK293-Zellen hergestellt (Kap. 3.4.1, 3.4.2). Dazu wurde das gleiche pRC/CMV-Vektorkonstrukt verwendet wie in Kap. 4.5 beschrieben. Es konnten zwei HEK293-Überexpressionsklone „HEK293/1R“ und „HEK293/2R“ isoliert werden, die ein deutliches Signal in der FACS-Analyse zeigen (Abb. 4.28). Der Klon

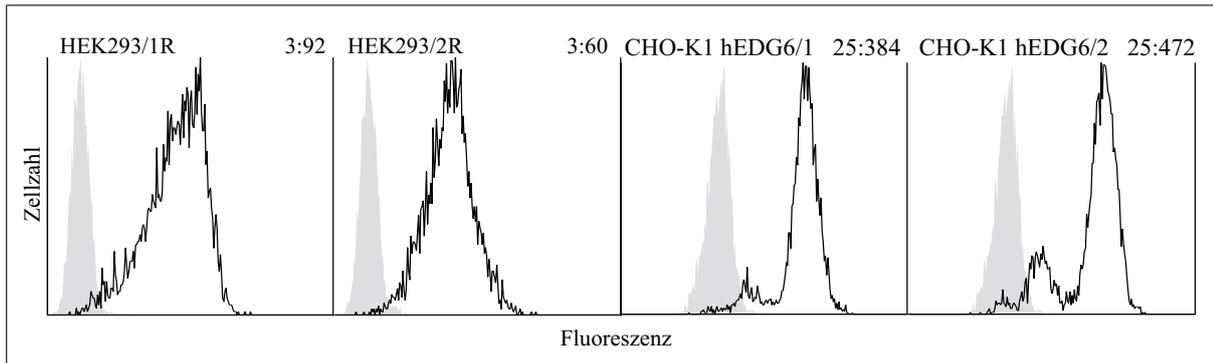


Abbildung 4.28: FACS-Analysen der mit humanem C-terminal *myc*-Epitop-markiertem EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) stabil transfizierten HEK293 und CHO-K1-Zellen. Die Zahlen geben das Verhältnis der Expression des humanen EDG6-*myc* zwischen der Negativkontrolle ohne 1. Antikörper bei HEK293-Zellen beziehungsweise nicht transfizierter CHO-K1-Zellen und der mit dem 9E10 anti-*myc*-Epitop Antikörper markierten Probe wieder (lineares Mittel der Fluoreszenz). Sämtliche Zellen sind zur Detektion des intrazellulären *myc*-Epitops permeabilisiert worden (Kap. 3.20.1).

„HEK293/2R“ ist für die radioaktiven Bindungsassays eingesetzt worden.

Für weitere Funktionsanalysen sind ebenfalls stabil humanen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor überexprimierende CHO-K1-Zellen hergestellt worden. Dabei konnten zwei CHO-K1-Zellklone „CHO-K1 hEDG6/1“ und „CHO-K1 hEDG6/2“ isoliert werden, die den humanen EDG6-Rezeptor stark überexprimieren (Abb. 4.28).

4.8.2 Bindung von Sphingosin-1-phosphat an EDG-6

Der radioaktive Bindungsassay wurde in dem Labor von Dr. Sarah Spiegel an der GUMC-Washington durchgeführt. Dazu wurde mit Hilfe rekombinanter Sphingosinkinase enzymatisch synthetisiertes [^{32}P]Sphingosin-1-phosphat (S1P) hergestellt und mit EDG6-transfizierten und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen inkubiert (Kap. 4.8.1). Die [^{32}P]S1P Bindung ist anschließend mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt worden (Van Brocklyn *et al.*, 2000). Das Ergebnis dieser Versuche war, daß S1P mit einer Dissoziationskonstante von 63nM an EDG6 bindet. Diese Bindung ist spezifisch, so daß lediglich nicht radioaktiv markiertes S1P und Dihydro-S1P um die EDG6-Bindung mit [^{32}P]S1P konkurrieren können, nicht jedoch andere Lipidderivate wie Lysophosphatidylsäure (Abb. 4.29). Dihydro-S1P bindet an EDG6 mit einer Dissoziationskonstante von 210nM, Sphingosylphosphorylcholin mit 4,6 μM (Van Brocklyn *et al.*, 2000).

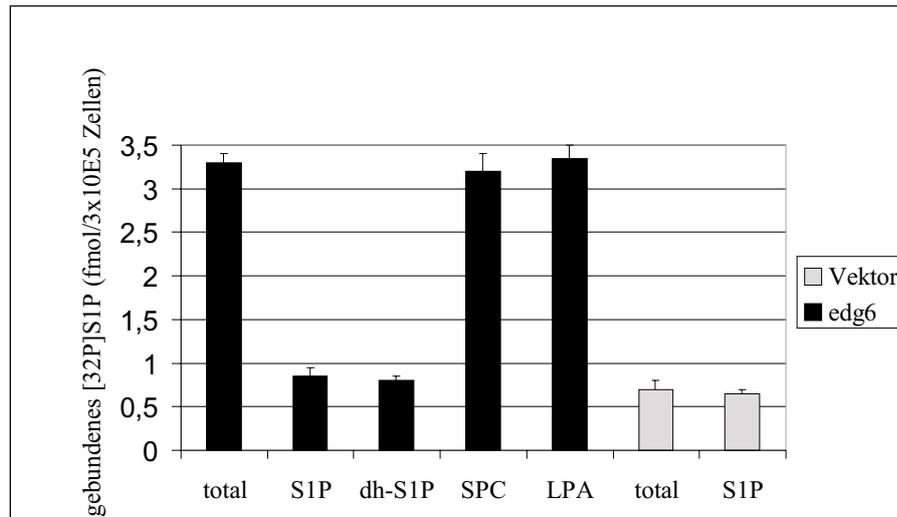


Abbildung 4.29: Radioaktiver Bindungsassay mit [^{32}P]Sphingosin-1-phosphat (S1P) auf *edg6*- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen. Die Bindung von 0,5nM [^{32}P]S1P wurde in Abwesenheit (total) oder in Anwesenheit eines 1000-fachen Überschusses der angegebenen Lipidderivate S1P, Dihydro-S1P (dh-S1P), Sphingosylphosphorylcholin (SPC) und Lysophosphatidylsäure (LPA) gemessen ($n \geq 3$, Mittelwerte + Standardabweichung). Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sarah Spiegel an der GUMC-Washington durchgeführt.

4.9 Nachweis der G-Protein-Kopplung an EDG6

Nachdem der Ligand des EDG6-Rezeptors bekannt war, war es möglich, EDG6 gezielt durch Zugabe von Sphingosin-1-phosphat (S1P) zu aktivieren. Dadurch wurde es möglich, nach intrazellulären Signalwegen zu suchen, die bei Aktivierung von EDG6 über S1P an der EDG6-spezifischen Signalweiterleitung beteiligt sind. Da EDG6 zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählt, war ein erster Schritt die Identifizierung der an der Signalweiterleitung beteiligten trimären G-Proteine (Kap. 1.1.2).

4.9.1 Vergleich des RNA-Expressionsmusters von EDG6 und G alpha 16

Ein interessanter Aspekt hinsichtlich der G-Protein-Kopplung ergab sich zunächst durch die genomisch in Mensch und Maus konservierte Nachbarschaft des *Gna15/16*-Gens mit dem *edg6*-Gen (Kap. 4.4). Das Expressionsmuster der durch das *Gna16*-Gen kodierten humanen $\text{G}\alpha 16$ -Untereinheit trimärer G-Proteine ist als spezifisch für hämatopoietische Zellen beschrieben (Amatruda *et al.*, 1991). Um das Expressionsmuster der $\text{G}\alpha 16$ -Untereinheit mit dem des EDG6-Rezeptors vergleichen zu können, wurde mit den Primern hsga165 und hsga163 (Kap. 2.7) eine Polymerase-Kettenreaktion mit cDNA aus CEM-Zellen durchgeführt, bei der ein 399 bp-Fragment aus dem 3'-nichttranslatierten Bereich der humanen $\text{G}\alpha 16$ -cDNA amplifiziert werden

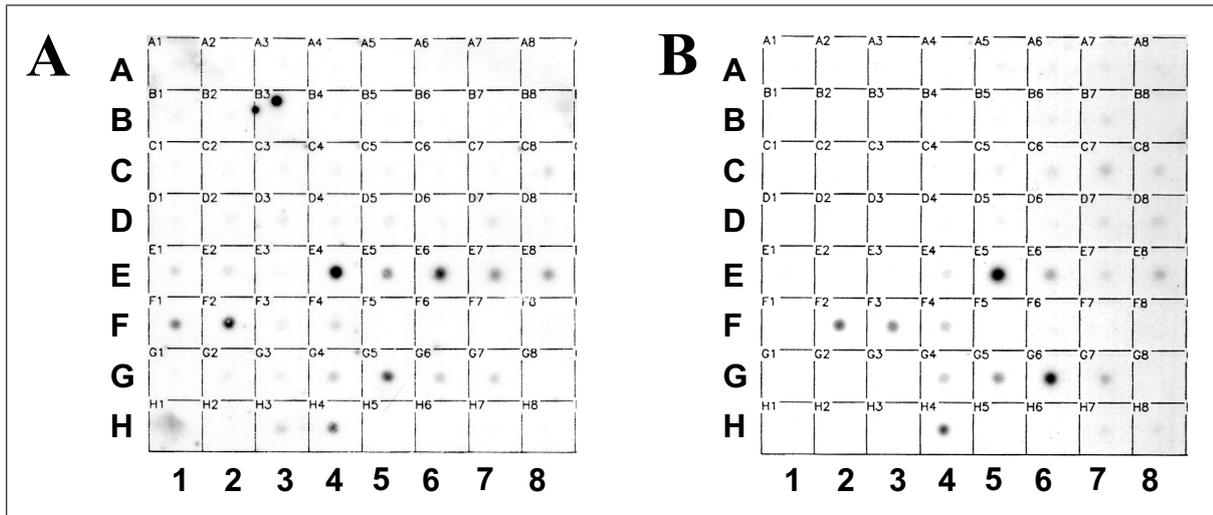


Abbildung 4.30: Dot-Blot mit 50 humanen mRNA-Proben (Clontech), hybridisiert mit spezifischer humaner *edg6*-cDNA (bp 438-842, EMBL-Datenbankeintrag AJ000479) (A) und mit spezifischer humaner $G\alpha 16$ -cDNA (bp 1392-1790, GenBank Datenbankeintrag NM002068) (B). Die Probenauftragung entspricht der aus Abb. 4.12.

konnte (bp 1392-1790, GenBank Datenbankeintrag NM002068, PCR-Bedingungen: (1) 95°C, 2min; (2) 94°C, 1min; (3) 55°C, 1min; (4) 72°C, 1min; 30 Zyklen (2-4), (5) 72°C, 5min). Dieses Fragment ist nach Restriktion mit *Bam*HI (G/GATCC) in den pZerO-2-Vektor inkloniert und als spezifische Sonde für die humane $G\alpha 16$ -mRNA bei der Hybridisierung des humanen mRNA-Gewebe-Dot-Blots (Clontech) verwendet worden (Kap. 3.14.2). Ein Vergleich des $G\alpha 16$ -mRNA-Expressionsmusters mit dem des EDG6-Rezeptors ist in Abb. 4.30 dargestellt. Wie deutlich zu sehen ist, ist die $G\alpha 16$ -mRNA-Expression in humanen Geweben nicht nur auf das hämatopoietische System beschränkt, sondern zum Beispiel auch in einigen lymphatischen Geweben zu finden. Die mit Abstand stärkste $G\alpha 16$ -mRNA-Expression ist in adultem und fötalem Thymus (E5, G6) vorhanden, gefolgt von einer moderaten Expression in adulter Lunge (F2), Luftröhre (F3), peripheren Leukozyten (E6) und fötaler Milz (G5). Eine schwache Expression ist in adultem Knochenmark (E8), Prostata (C7) und Placenta (F4) sowie in fötaler Leber (G4) und Lunge (G7) zu detektieren (Die in Klammern angegebenen Positionen beziehen sich auf Abb. 4.30B). Im Vergleich zur *edg6*-mRNA-Expression (Abb. 4.12) ist die $G\alpha 16$ -Untereinheit deutlich unterschiedlich exprimiert, so daß die Expressionsmuster von *edg6* und $G\alpha 16$ nicht auf eine funktionelle Wechselwirkung schließen lassen.

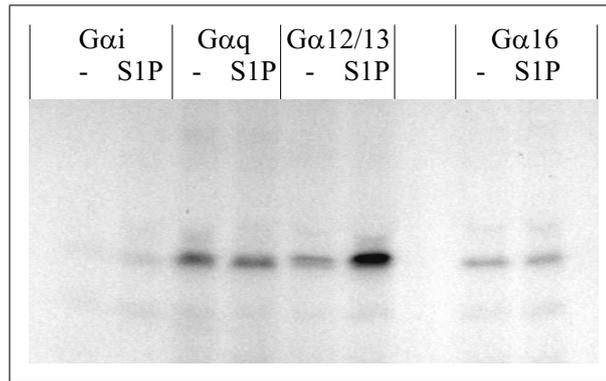


Abbildung 4.31: Autoradiogramm der Immunpräzipitation und anschließender Gelelektrophorese unterschiedlicher G α -Untereinheiten trimärer G-Proteine aus CHO-K1 hEDG6/2 Zellen (Abb. 4.28) mit gebundenem [α^{32} P]GTP-Azidoanilid unstimuliert und nach Stimulierung mit 1 μ M Sphingosin-1-phosphat (S1P). Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Robert Grosse am Institut für Pharmakologie der FU-Berlin durchgeführt.

4.9.2 Stimulierungsabhängige G-Protein-Kopplung an EDG6

Die Untersuchung der G-Protein-Kopplung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Robert Grosse am Institut für Pharmakologie der FU-Berlin durchgeführt. Dazu wurden Membranpräparationen der CHO-K1 hEDG6/2-Zellen (Abb. 4.28) mit 1 μ M Sphingosin-1-phosphat stimuliert und mit dem photoreaktiven GTP-Analog [α^{32} P]GTP-Azidoanilid inkubiert (Laugwitz et al., 1994). Das GTP-Azidoanilid wird nicht mehr effizient hydrolysiert und bleibt an aktivierten G α -Untereinheiten trimärer G-Proteine gebunden, die dadurch in den Zellen akkumulieren. Die G α -Untereinheiten mit dem gebundenen [α^{32} P]GTP-Azidoanilid wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht (Laugwitz *et al.*, 1994). Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist eine deutliche Aktivierung der G α 12/13-Untereinheiten sowie eine Aktivierung der G α i-Untereinheit, wobei weder die G α q, noch die G α 16-Untereinheiten an der Aktivierung beteiligt waren (Abb. 4.31). Bei einem Parallelversuch mit „gonadotropin-releasing hormone receptor“ (GnRHR) transfizierten CHO-K1-Zellen sind auch nach S1P-Stimulierung keine Aktivierungen von G α -Untereinheiten festgestellt worden, so daß die beobachtete Aktivierung der G α i und G α 12/13-Untereinheiten EDG6-spezifisch sind. Das schwache Signal der G α i-Untereinheit im Autoradiogramm ist experimentell bedingt und auf eine schwache Akkumulation der aktivierten G α i-Untereinheit zurückzuführen, läßt jedoch keinerlei Rückschlüsse auf die Intensität oder Spezifität der G-Protein-Kopplung zu.

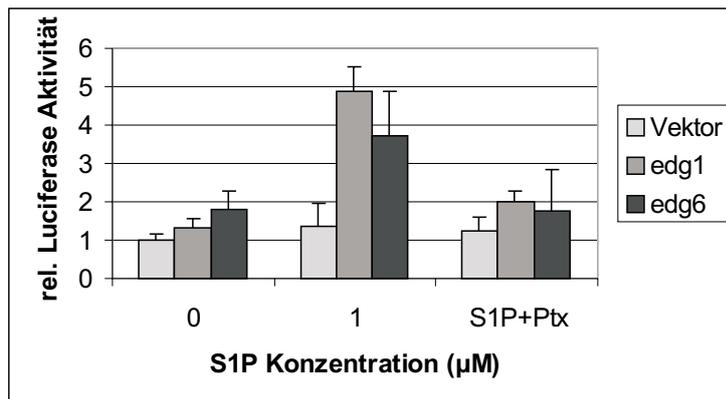


Abbildung 4.32: Luziferase-Assay zur Untersuchung der EDG1- und EDG6-spezifischen MAPK-Aktivierung in CHO-K1-Zellen, unstimuliert und nach Stimulierung mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P) sowie nach vorheriger zweistündiger Inkubation mit 100ng/ml Pertussistoxin (Pttx) ($n \geq 3$, Mittelwerte + Standardabweichung).

4.10 Signaltransduktion des EDG6-Rezeptors

Die Kenntnis der an den EDG6-Rezeptor koppelnden $G\alpha$ -Untereinheiten trimärer G-Proteine führte zur weiteren Untersuchung der Signalwege, die durch die $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten aktiviert werden.

4.10.1 Aktivierung der MAP-Kinase

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-(MAPK)-Stimulierung wurde mit Hilfe des Luziferase-Assays untersucht (Kap. 3.23). Dazu wurde *edg6* nach *HinDIII* (A/AGCTT) und *XbaI* (T/CTAGA) -Restriktion aus dem pRC/CMV-Vektor in den pcDNA3.1-Vektor umkloniert. Dieser Schritt wurde notwendig, da der pRC/CMV-Vektor aus noch ungeklärten Gründen eine erhöhte Hintergrundaktivierung im Luziferase-Assay zeigte. Außerdem wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Kap. 3.10.2) und cDNA aus HUVEC-Zellen sowie der Primer EDG1vh und EDG1r die *edg1*-kodierende cDNA amplifiziert und nach Sequenzierung (Kap. 3.19) und Restriktion mit *HinDIII* und *XbaI* in den entsprechend geschnittenen pcDNA3.1-Vektor kloniert (PCR-Bedingungen: (1) 95°C , 2min; (2) 94°C , 1min; (3) 55°C , 1min; (4) 72°C , 1min; 30 Zyklen (2-4), (5) 72°C , 5min). EDG1 wurde als Positivkontrolle verwendet, da eine EDG1-abhängige MAPK-Aktivierung nach Sphingosin-1-phosphat-(S1P)-Stimulierung bereits beschrieben wurde (Lee *et al.*, 1996). Das Prinzip dieses Assays besteht darin, daß ein Transaktivatorplasmid mit einer Elk1-Aktivator-domäne und einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne von den aktivierten Erk1/2-Kinasen phosphoryliert wird und in phosphorylierter Form an die

GAL4-Bindungsstelle des Luziferase-Reporter-Plasmids bindet. Durch diese Bindung wird der synthetische Promotor des Luziferase-Reporter-Plasmids aktiviert und leitet die Synthese der Luziferase ein. Die Menge an synthetisierter Luziferase gibt somit Aufschluß über den Grad der Aktivierung der MAPK Erk1/2.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist, daß EDG6 nach Stimulierung mit $1\mu\text{M}$ S1P die MAPK Erk1/2 in CHO-K1-Zellen spezifisch aktiviert (Abb. 4.32). Der Grad der Aktivierung ist mit einem etwa 2-fachen Anstieg der Luziferase-Aktivität etwas geringer als bei EDG1, dessen Aktivierung zu einem 3,5- bis 4-fachen Anstieg der Luziferase-Aktivität gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen führt. Sowohl bei EDG1, als auch bei EDG6 kann die Aktivierung der MAPK durch vorherige Inkubation der CHO-K1-Zellen für 2h mit 100ng/ml Pertussistoxin inhibiert werden. Da Pertussistoxin die Aktivierung der $G_{\alpha i}$ -Untereinheit trimärer G-Proteine irreversibel inhibiert (Kap. 1.1.2), ist damit indirekt auch die Beteiligung der $G_{\alpha i}$ -Untereinheit an der MAPK-Aktivierung gezeigt, was mit den gesammelten Daten bezüglich der G-Protein-Kopplung von EDG6 (Kap. 4.9.2) als auch mit bereits publizierten Daten bezüglich der G-Protein-Kopplung von EDG1 übereinstimmt (Lee *et al.*, 1996).

4.10.2 Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration

Ein weiterer Signalweg, der unter anderem über die $G_{\alpha i}$ -Untereinheit trimärer G-Proteine gesteuert werden kann, ist der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Dazu wurde ein Calcium-Assay durchgeführt (Kap. 3.24) und die stabil humanen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) überexprimierenden CHO-K1 hEDG6/1-Zellen (Abb. 4.28) und Jurkat J12R-Zellen (Abb. 4.37) mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P) stimuliert. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 4.33 dargestellt. Wie deutlich zu sehen ist, zeigen sowohl die untransfizierten CHO-K1-Zellen, als auch die untransfizierten Jurkat-Zellen bereits einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulierung mit $1\mu\text{M}$ S1P. Die humanen EDG6-*myc* transfizierten CHO-K1 und Jurkat-Zellen zeigen hingegen keinen zusätzlichen Anstieg dieses Signals, sondern vergleichsweise eher einen Abfall (Abb. 4.33).

4.10.3 Aktivierung der Phospholipase C

Mit den CHO-K1 und CHO-K1 hEDG6/2-Zellen (Abb. 4.28) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Robert Grosse am Institut für Pharmakologie der FU-Berlin der intrazelluläre Anstieg von Inositolphosphat (IP) nach Stimulierung mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P) bestimmt (Methode siehe Grosse *et al.*, 2000). Das Ergebnis dieser Versuche ist, daß die S1P-stimulierten stabil EDG6 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten CHO-K1-Kontrollzellen

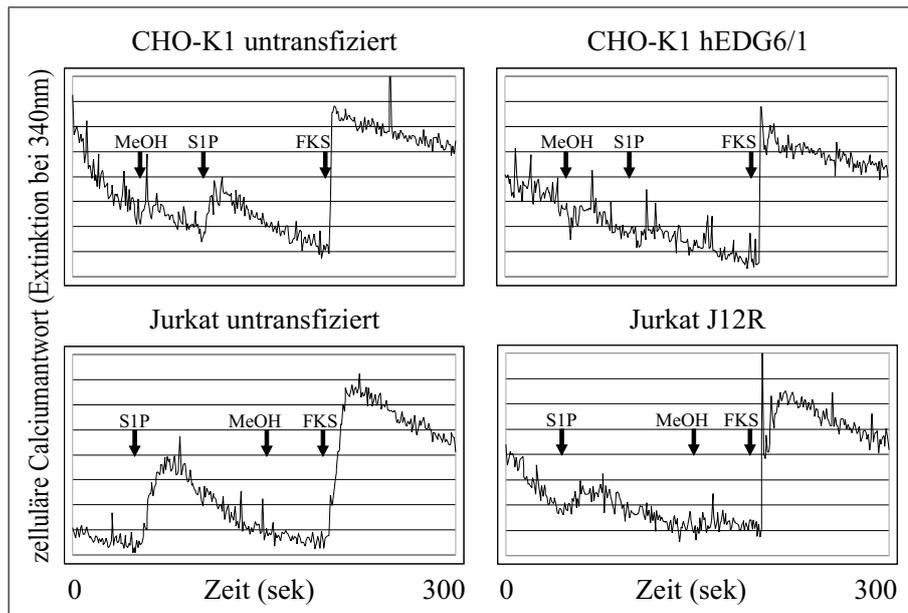


Abbildung 4.33: Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in nicht transfizierten und stabil C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor überexprimierenden CHO-K1 (CHO-K1 hEDG6/2, Abb. 4.28) und Jurkat (Jurkat J12R, Abb. 4.37) Zellen nach Zugabe von 1% Methanol (MeOH), $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P) und 1% fötalem Kälberserum (FKS). Die Zugabe von 1% Methanol diente als Negativkontrolle, da S1P in Methanol gelöst war, 1% FKS wurde als Positivkontrolle verwendet.

einen etwa 2-fachen Anstieg der IP-Produktion zeigen, der Pertussistoxin-sensitiv ist und daher über $G_{\alpha i}$ mit der Aktivierung des Rezeptors gekoppelt ist (Abb. 4.34). Der Anstieg an intrazellulärem IP ist ein indirekter Nachweis der Phospholipase C (PLC)-Aktivität, da PLC Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) hydrolysiert (Kap. 1.1.3). Somit konnte gezeigt werden, daß in EDG6 überexprimierenden CHO-K1-Zellen über die spezifische Aktivierung von EDG6 mit $1\mu\text{M}$ S1P eine $G_{\alpha i}$ -vermittelte intrazelluläre Aktivierung der PLC erfolgt.

4.11 Zelluläre Effekte des EDG6-Rezeptors

Um festzustellen, welche Auswirkungen die beschriebenen Signaltransduktionswege auf das zelluläre System ausüben, wurden zum einen Veränderungen des Zytoskeletts untersucht, die unter anderem über $G_{\alpha 12/13}$ und Rho-vermittelte Signalwege eingeleitet werden, zum anderen wurde das Migrationsverhalten von Zellen beobachtet, das häufig über die $G_{\alpha i}$ -Untereinheit trimärer G-Proteine vermittelt wird.

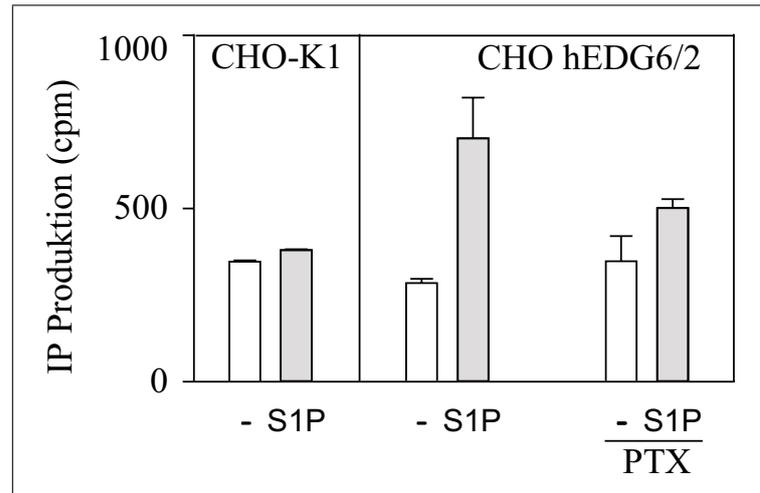


Abbildung 4.34: Bestimmung der Inositolphosphat-(IP)-Produktion in nicht transfizierten CHO-K1-Zellen und CHO-K1 hEDG6/2-Zellen (Abb. 4.28), unstimuliert und nach Stimulierung mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P) sowie nach vorheriger Inkubation mit 100ng/ml Pertussistoxin (Ptx) ($n \geq 2$, Mittelwerte + Standardabweichung). Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Robert Grosse am Institut für Pharmakologie der FU-Berlin durchgeführt.

4.11.1 RhoA-abhängige Veränderungen des Zytoskeletts

Für die Untersuchung von Zytoskelettveränderungen wurden die stabil C-terminal *myc*-Epitop-markierten humanen EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) überexprimierenden CHO-K1 *hedg6/1* und CHO-K1 hEDG6/2-Zellen (Abb. 4.28) sowie nicht transfizierte CHO-K1-Zellen verwendet. Zur Untersuchung der Rho-Abhängigkeit der beobachteten Veränderungen wurden diese Zellen außerdem mit dem Wildtyp-RhoA oder mit der nicht funktionellen N19-RhoA-Mutante in pcDNA3.1 transfiziert (Kap. 3.4.1). Die Aktinfilamente wurden anschließend mit Alexa-Fluor-488-markiertem Phalloidin angefärbt (Kap. 3.21).

Veränderungen in nicht transfizierten und EDG6-transfizierten CHO-K1-Zellen

Zunächst wurden EDG6-*myc*-transfizierte und nicht transfizierte CHO-K1-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen nicht oder für 20min mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat-(S1P)-stimuliert, anschließend fixiert, permeabilisiert und die Aktinfasern mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (Kap. 3.21). Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist, daß die EDG6-*myc* überexprimierenden CHO-K1-Zellen nach Stimulierung eine deutliche Zunahme an peripheren Streßfasern, an abgerundeten Zellen sowie an langen Filopodien aufweisen im Vergleich zu den nicht stimulierten EDG6-*myc* überexprimierenden Zellen (Abb. 4.35A). Nicht transfizierte CHO-K1-Kontrollzellen zeigten nach S1P-Stimulierung zwar auch eine Zunahme an peripheren Stressfasern und an ab-

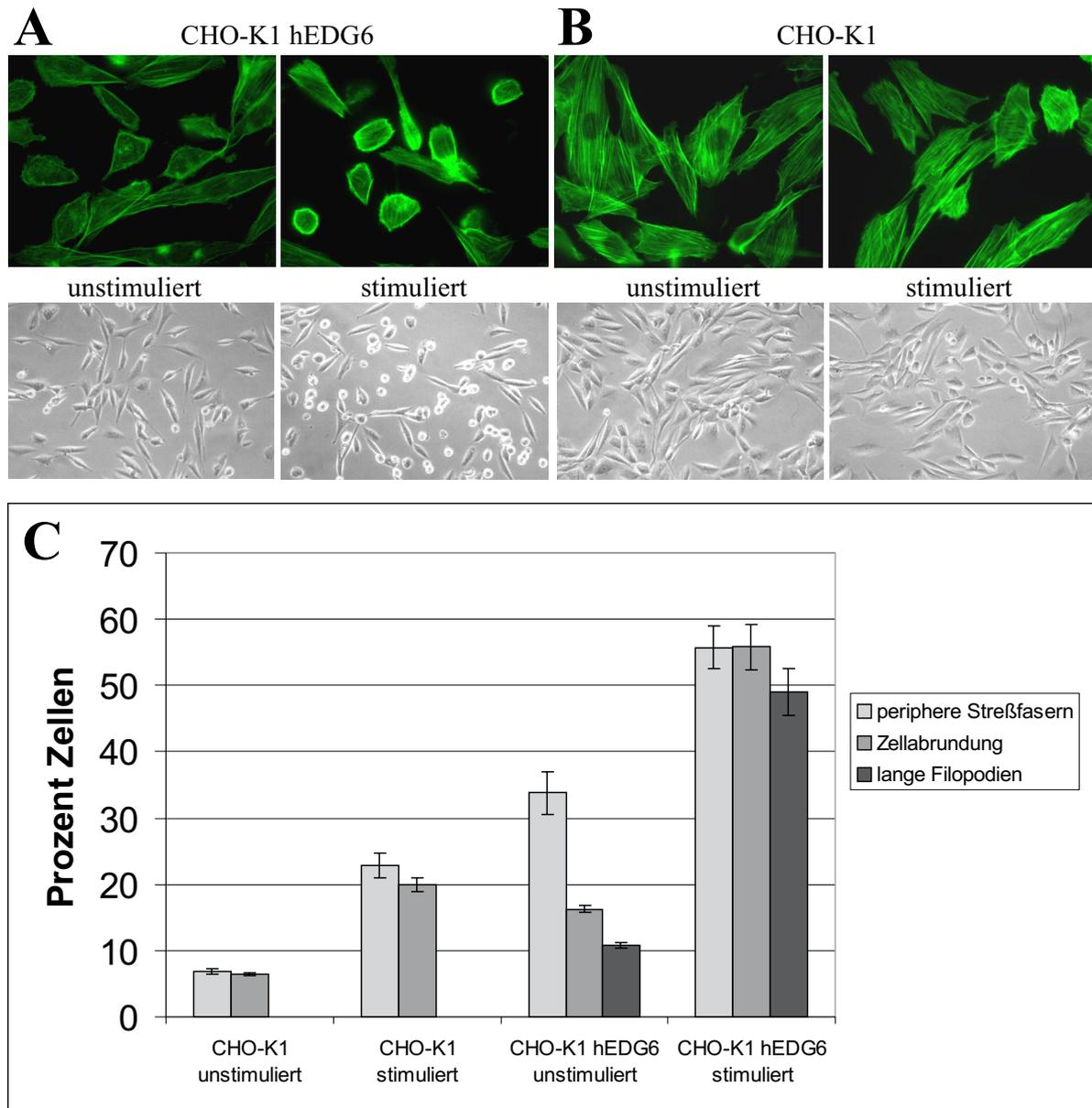


Abbildung 4.35: Zytoskelettveränderungen in (A) humanen EDG6-*myc* transfizierten CHO-K1-Zellen (Abb. 4.28) und (B) nicht transfizierten CHO-K1-Zellen. Im unteren Bereich sind jeweils lichtmikroskopische Aufnahmen abgebildet. Eine Quantifizierung der Zellen nach den Kriterien der Ausbildung peripherer Streßfasern, abgerundeter Zellen und langer Filopodien ist in (C) dargestellt (n=50-300, Mittelwerte \pm Standardabweichung). Stimuliert wurden die Zellen für 20min mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P), der Nachweis der Aktinfasern erfolgte mit Alexa-Fluor-488-markiertem Phalloidin (Kap. 3.21).

gerundeten Zellen, die aber deutlich geringer ausfiel als bei den EDG6-*myc*-transfizierten CHO-K1-Zellen. Zudem zeigten die nicht transfizierten CHO-K1-Zellen auch nach S1P-Stimulierung keine verstärkte Entwicklung von langen Filopodien. Die unstimulierten EDG6-*myc* überexprimierenden CHO-K1-Zellen hatten bereits einen ähnlichen Phänotyp wie die S1P-stimulierten

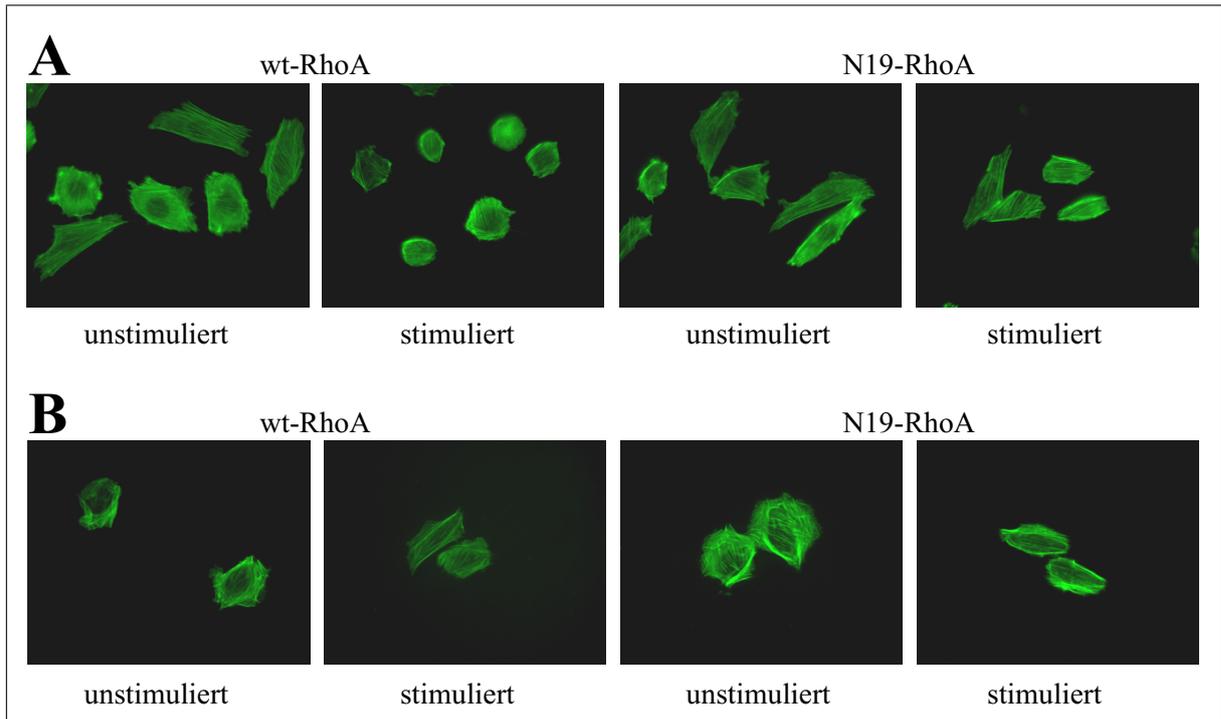


Abbildung 4.36: Zytoskelettveränderungen in (A) stabil humanen EDG6-*myc* transfizierten CHO-K1-Zellen (Abb. 4.28) und (B) CHO-K1-Kontrollzellen. Die Zellen wurden zusätzlich transient mit dem Wildtyp-(wt)-RhoA oder dem nicht funktionellen dominant negativen N19-RhoA-Konstrukt transfiziert. Stimuliert wurde für 20min mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P), der Nachweis der Aktinfasern erfolgte mit Alexa-Fluor-488-markiertem Phalloidin (Kap. 3.21).

nicht transfizierten CHO-K1 Kontrollzellen (Abb. 4.35B). Der Phänotyp der S1P-stimulierten und nicht stimulierten EDG6-*myc* überexprimierenden und nicht transfizierten CHO-K1-Zellen ist nach den Merkmalen der Ausbildung peripherer Streßfasern, abgerundeter Zellen sowie langer Filopodien quantifiziert worden, wobei nach Stimulierung der Zellen mit $1\mu\text{M}$ S1P für 20min ein EDG6 spezifischer Anstieg aller drei genannten Merkmale deutlich wird (Abb. 4.35C). Die mikroskopische Auswertung der Daten wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Angelika Kusch (Max-Delbrück-Centrum und Franz-Volhard-Klinik Berlin) durchgeführt.

Veränderungen in Wildtyp-RhoA und N19-RhoA-transfizierten CHO-K1-Zellen

Um zu prüfen, ob die beobachteten Zytoskelettveränderungen Rho-abhängig sind, wurden die nicht transfizierten und die stabil EDG6-*myc* transfizierten CHO-K1-Zellen mit einem Wildtyp- und einem funktionslosen N19-RhoA-Konstrukt in dem Vektor pcDNA3.1 (Kap. 2.3) kotransfiziert (Kap. 3.4.1). Dabei konnte beobachtet werden, daß die stabil EDG6-*myc* transfizierten

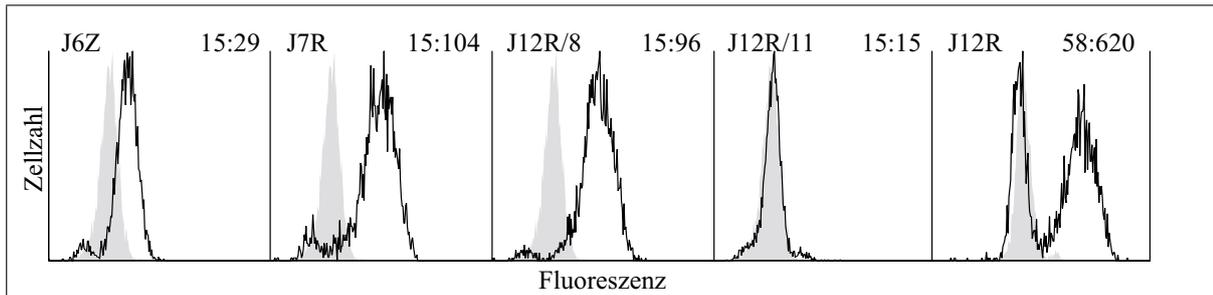


Abbildung 4.37: FACS-Analysen der mit humanem C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) stabil transfizierten Jurkat-Zellen. Die Zahlen geben das Verhältnis der Expression des humanen EDG6-*myc* zwischen nicht transfizierten Jurkat-Zellen und des jeweiligen Jurkat-Klons an (lineares Mittel der Fluoreszenz). Der Klon J12R/11 dient als Vektor-transfizierte Negativkontrolle. Sämtliche Zellen sind zur Detektion des intrazellulären *myc*-Epitops permeabilisiert worden (Kap. 3.20.1).

CHO-K1-Zellen nach transients Transfektion mit dem Wildtyp-RhoA-Konstrukt das gleiche Verhalten zeigten wie zuvor (Abb. 4.36A). Nach transients Transfektion mit dem dominant negativen N19-RhoA-Konstrukt befanden sich jedoch deutlich weniger Zellen in dem durch eine erhöhte Anzahl peripherer Streßfasern, abgerundeter Zellen sowie langer Filopodien charakterisierten aktivierten Zustand. Der Unterschied war vor allem nach Stimulierung der Zellen mit $1\mu\text{M}$ S1P zu beobachten, während in den entsprechend transfizierten CHO-K1-Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied auszumachen war (Abb. 4.36B). Damit sind diese phänotypischen Beobachtungen ein erster Hinweis für die Rho-Abhängigkeit der beschriebenen Zytoskelettveränderungen.

4.11.2 Migrationseffekte überexprimierender Jurkat-Zellen

Herstellung humanen EDG6-Rezeptor überexprimierender Jurkat-Zellen

Zur Untersuchung EDG6-spezifischer Migrationseffekte wurden unterschiedliche stabil humanen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) überexprimierende und stabil Vektor-transfizierte Jurkat-Zellen hergestellt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie und dem spezifischen anti-*myc*-Epitop Antikörper 9E10 analysiert (Kap. 3.4.2, 3.20). Wie in Abb. 4.37 zu sehen ist, konnten zwei stark überexprimierende Klone (J7R und J12R/8), ein schwach überexprimierender Klon (J6Z) sowie ein Vektor-transfizierter Klon (J12R/11) isoliert werden, mit denen unterschiedliche Migrationsexperimente durchgeführt wurden (Kap. 3.22). Außerdem wurde eine Mischpopulation aus einem stark überexprimierenden Klon und einem Klon ohne EDG6-*myc*-Expression (J12R) isoliert, der bereits für intrazelluläre Calcium-Assays eingesetzt wurde

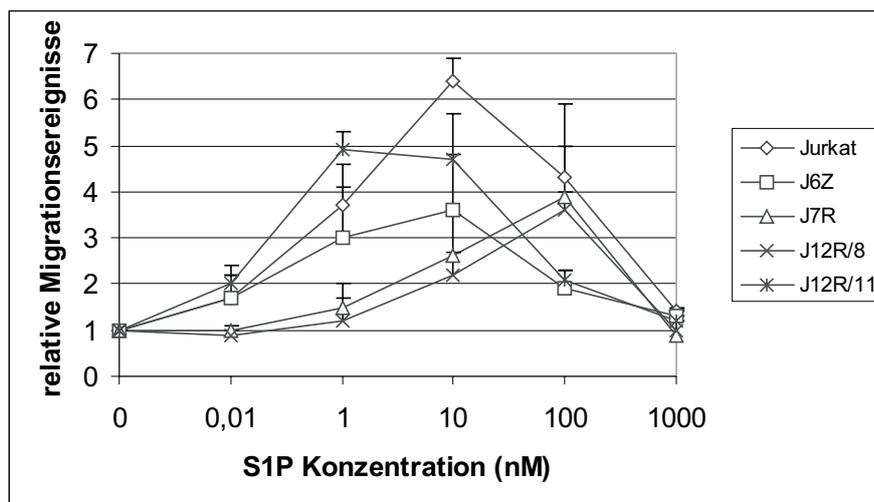


Abbildung 4.38: Migrationsexperimente mit Jurkat-Zellen, stark (J12R/8, J7R) und schwach (J6Z) stabil humanen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor überexprimierenden Jurkat-Zellen sowie stabil Vektor-transfizierten Jurkat-Kontrollzellen (J12R/11, Abb. 4.37). Die Zellen wurden in Transwell-Kammern (Kap. 3.22) einem Sphingosin-1-phosphat-(S1P)-Stimulus von 0,1nM bis 1 μ M ausgesetzt, die Spontanmigration ohne jeglichen Stimulus wurde gleich eins gesetzt ($n \geq 3$, Mittelwerte + Standardabweichung).

(Kap. 4.10.2). Die „R“-Klone wurden mit humanem EDG6-*myc* in dem Vektor pRC/CMV (Kap. 4.5), der „Z“-Klon mit humanem EDG6-*myc* in dem Vektor pZeoSV2(+) transfiziert (Kap. 4.6.2).

Migration gegen Sphingosin-1-phosphat

Jukat-Zellen exprimieren endogen alle sieben EDG-Rezeptoren EDG1 bis EDG7 (Motohashi *et al.*, 2000). Von EDG1 und EDG3 ist bekannt, daß sie auf einen Sphingosin-1-phosphat-(S1P)-Stimulus in einer Konzentration von 1 bis 10nM hin Zellen zur Migration anregen können (Kon *et al.*, 1999). Somit sind Jurkat-Zellen aufgrund der endogenen Expression von EDG1 und EDG3 in der Lage, auf einen S1P-Stimulus hin zu migrieren. In Abb. 4.38 ist die Migration der unterschiedlichen EDG6-*myc* exprimierenden Jurkat-Klone dargestellt. Wie deutlich zu sehen ist, liegt das Migrationsoptimum der nicht transfizierten Jurkat-Zellen, der Vektor-transfizierten Kontrolle J12R/11 sowie des schwach EDG6-*myc* überexprimierenden Klons J6Z im Bereich von 1 bis 10nM, während die beiden stark EDG6-*myc* überexprimierenden Klone J7R und J12R/8 ihr Optimum bei 100nM deutlich in den Bereich einer höheren S1P-Konzentration verschoben haben. Sämtliche gerichteten Migrationsereignisse können durch vorherige zweistündige Inkubation der Zellen mit 100ng/ml Pertussistoxin inhibiert werden. Da Pertussistoxin irreversibel die Akti-

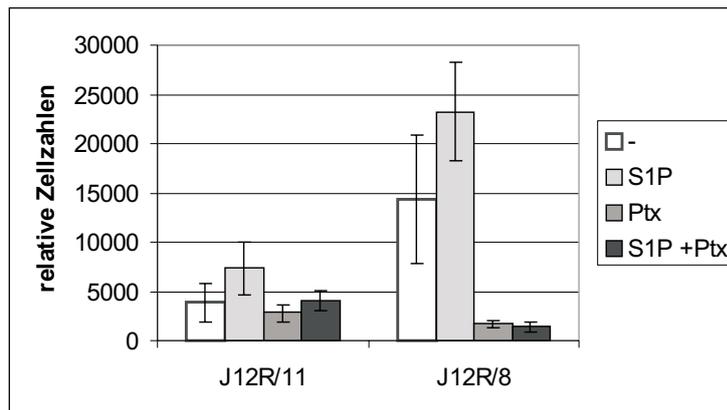


Abbildung 4.39: Spontanmigration der Vektor-transfizierten J12R/11 und der stabil humanen EDG6-*myc* überexprimierenden J12R/8 Jurkat-Zellklone ohne und mit 10 bis 100nM Sphingosin-1-phosphat (S1P) im Medium sowie ohne und nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit 100ng/ml Pertussistoxin (Ptx). Gezeigt sind die relativen Zahlen der migrierten Zellen (Zellen/min, Kap. 3.22, $n \geq 4$, Mittelwerte \pm Standardabweichung).

vierung der $G_{\alpha i}$ -Untereinheit trimärer G-Proteine blockiert (Kap. 1.1.2), konnte indirekt die Beteiligung der $G_{\alpha i}$ -Untereinheit an der zur Migration führenden intrazellulären Signaltransduktion gezeigt werden.

Migration nach Inkubation mit Pertussistoxin

Eine interessante Beobachtung leitete sich aus der zweistündigen Inkubation der Jurkat-Zellklone mit 100ng/ml Pertussistoxin ab. Ohne Stimulus zeigen die Vektor-transfizierten Jurkat-Kontrollzellen J12R/11 eine geringe Spontanmigration, die auch nach Inkubation mit Pertussistoxin erhalten bleibt (Abb. 4.39). Die stabil EDG6-*myc*-transfizierten Jurkat-Zellen J12R/8 hingegen zeigen eine deutlich höhere Spontanmigration, die durch Zugabe von Pertussistoxin auf das 7-fache reduziert werden kann. Der Einfluß von Pertussistoxin zeigt, daß eine Rezeptorvermittelte Aktivität an der Spontanmigration dieses Jurkat-Zellklons beteiligt ist, so daß EDG6 offensichtlich die erhöhte Spontanmigration der Zellen induziert (Abb. 4.39). Durch Zugabe von 10 bis 100nM Sphingosin-1-phosphat (S1P) nicht als Gradient für die Migration, sondern als allgemeiner Bestandteil des Mediums wurde die Spontanmigration der J12R/11 und J12R/8-Zellklone leicht erhöht, es ließen sich aber keine weiteren Unterschiede zwischen der Vektorkontrolle und den EDG6-*myc* überexprimierenden Jurkat-Zellen ausmachen, so daß die erhöhte Spontanmigration der J12R/8-Zellen nicht von einer Aktivierung des EDG6-Rezeptors durch S1P abhängt.

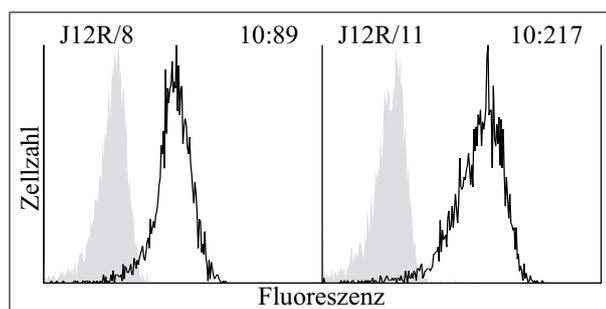


Abbildung 4.40: FACS-Analysen der mit humanem EDG6-*myc* und Vektor-transfizierten Jurkat-Zellklone J12R/8 und J12R/11 (Abb. 4.37) mit dem spezifischen anti-humanen-CXCR4 Antikörper 2B11-1-4. Die Zahlen geben das Verhältnis der Isotypkontrolle mit dem anti-murinen-CXCR5 Antikörper 2G8-2 und dem anti-humanen-CXCR4 Antikörper 2B11-1-4 an (lineares Mittel der Fluoreszenz).

Nachweis von CXCR4 auf Jurkat-Zellen

Um festzustellen, ob EDG6 einen Einfluß auf Chemokin-induzierte Migrationsereignisse hat, wurde die Migration der EDG6-*myc* überexprimierenden und der Vektor-transfizierten Jurkat-Zellklone J12R/8 und J12R/11 (Abb. 4.37) mit dem endogen exprimierten CXCR-Rezeptor 4 (CXCR4) gegen den entsprechenden Liganden SDF-1 untersucht. Daß CXCR4 die Migration gegen einen SDF-1-Gradienten einleiten kann, ist bereits in einem anderem Zusammenhang beschrieben worden (Mohle *et al.*, 1998). Vor dem eigentlichen Migrationsexperiment wurde zunächst die Expression von CXCR4 auf den Jurkat-Zellklonen bestimmt. Wie in Abb. 4.40 zu sehen ist, exprimieren die beiden Jurkat-Zellklone J12R/8 und J12R/11 CXCR4 in hohen Mengen auf der Zelloberfläche.

Migration gegen SDF-1

Die Untersuchung der Migration gegen SDF-1 ist insofern interessant, da die bisherigen Ergebnisse einen allgemeinen Einfluß des EDG6-Rezeptors auf Migrationsereignisse möglich erscheinen lassen. Zu diesen Ergebnissen zählen einerseits die Verschiebung des Migrationsoptimums gegen Sphingosin-1-phosphat (S1P) hin zu zehnmal höheren S1P-Konzentrationen bei stark EDG6-*myc* überexprimierenden Jurkat-Zellen (Abb. 4.38), andererseits die höhere Spontanmigration dieser Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Kontrollzellen (Abb. 4.39). Daher wurde mit der SDF-1-induzierten Migration der endogen CXCR4 exprimierenden Jurkat-Zellklone (Abb. 4.40) der Einfluß des EDG6-Rezeptors auf Chemokin-induzierte Migrationsereignisse untersucht, um mögliche Wechselwirkungen herauszufinden. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 4.41 dargestellt. Wie deutlich zu sehen ist, wird die Migration gegen 10nM SDF-1 vom EDG6-Rezeptor nicht beeinflusst, da sowohl der EDG6-*myc* überexprimierende Klon J12R/8, wie auch der Vektor-

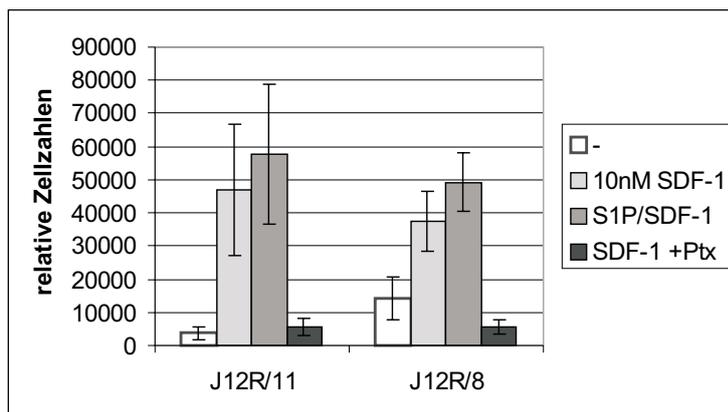


Abbildung 4.41: Migration der Vektor-transfizierten J12R/11 und der stabil humanen EDG6-*myc* überexprimierenden J12R/8 Jurkat-Zellklone gegen 10nM SDF-1 sowie ohne und nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit 100ng/ml Pertussistoxin (Ptx). Als Kontrolle ist die Spontanmigration der Zellen ohne Stimulus dargestellt, zur Aktivierung des EDG6-Rezeptors wurde dem Medium in einem Versuch außerdem 10nM Sphingosin-1-phosphat (S1P) zugegeben. Gezeigt sind die relativen Zahlen der migrierten Zellen (Zellen/min, Kap. 3.22, $n \geq 2$, Mittelwerte \pm Standardabweichung).

transfizierte Klon J12R/11 in gleicher Weise auf einen entsprechenden SDF-1-Stimulus hin zu migrieren vermögen, unabhängig von der Ab- oder Anwesenheit von 10nM S1P im Medium. Allerdings ist auch in diesem Versuch eine deutlich erhöhte Spontanmigration der EDG6-*myc* überexprimierenden J12R/8-Zellen zu beobachten, was die auf die Spontanmigration bezogene relative Migrationszunahme nach SDF-1-Stimulierung von etwa Faktor 12 bei dem Vektor-transfizierten J12R/11-Klon auf Faktor 2 bis 3 bei dem EDG6-*myc*-transfizierten J12R/8-Klon schrumpfen läßt. Die Spontanmigration nach zweistündiger Vorbehandlung der Zellen mit 100ng/ml Pertussistoxin hingegen ist bei beiden Zellklonen die gleiche und entspricht etwa der Spontanmigration der unbehandelten Vektor-transfizierten Kontrolle J12R/11, was wiederum eine Bestätigung für den G α i-abhängigen Einfluß des EDG6-Rezeptors auf die Spontanmigration der Jurkat-Zellen darstellt (Abb. 4.41).

4.12 Regulation der Oberflächenexpression des EDG6-Rezeptors

Da bislang schon fünf EDG-Rezeptoren bekannt sind, die Sphingosin-1-phosphat (S1P) als Ligand binden, lag die Vermutung nahe, daß die Expression dieser Rezeptoren auf der Zelloberfläche einer besonderen Regulation unterliegt, so daß nicht alle möglichen S1P-bindenden EDG-Rezeptoren zur gleichen Zeit auf der Zelloberfläche präsent sind und aktiviert werden können. Zudem spielt die Oberflächenexpression bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei der funktio-

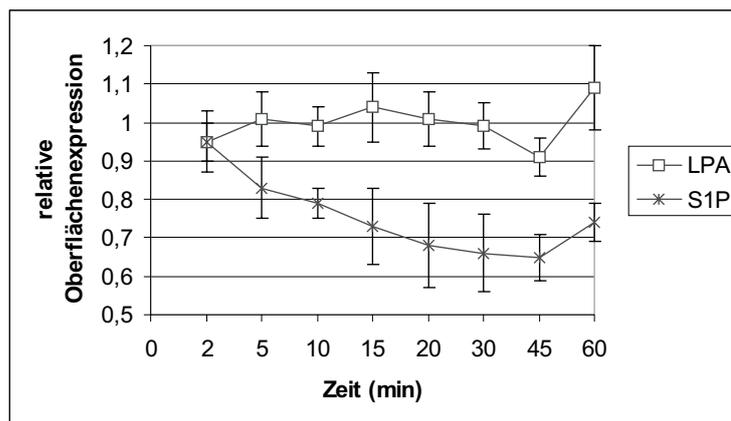


Abbildung 4.42: Bestimmung der Oberflächenexpression des murinen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptors (EDG6-*myc*) auf transient transfizierten HEK293-Zellen mit den spezifischen anti-murinen-EDG6-Rezeptor Antikörpern 8B4-1-1, 2A1-1-1 und 6D7-1 nach Stimulierung mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P) oder $1\mu\text{M}$ Lysophosphatidylsäure (LPA). Die Angaben beziehen sich auf den relativen Anteil des spezifischen EDG6-Signals in der FACS-Analyse, wobei das Signal der unstimulierten Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt gleich eins gesetzt wurde ($n \geq 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichung).

nellen Regulation des Rezeptors wie beispielsweise der Desensitivierung (Ferguson und Caron, 1998).

4.12.1 Rezeptorinternalisierung nach Sphingosin-1-phosphat-Stimulierung

Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beobachtet man häufig nach einer Stimulierung des Rezeptors einen Internalisierungsprozeß, der zu einer Herunterregulierung der auf der Oberfläche exprimierten Anzahl an Rezeptoren führt (Koenig und Edwardson, 1997). Um festzustellen, ob dieser Prozeß auch beim EDG6-Rezeptor zu beobachten ist, wurden HEK293-Zellen transient mit dem murinen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*, Kap. 4.6.3) transfiziert (Kap. 3.4.1). Nach dem Ernten der Zellen wurden sie in serumfreiem A-Medium inklusive 25mM HEPES, pH 7,35 aufgenommen und bei 37°C inkubiert, wobei nach festgelegten Zeitpunkten $100\mu\text{l}$ -Aliquots abgenommen und in 1,4ml eiskaltem PBS-d auf Eis fixiert wurden (Kap. 3.2.2). Die gesammelten Aliquots sind anschließend mit Hilfe der anti-murinen-EDG6 Antikörper 8B4-1-1, 2A1-1-1 und 6D7-1 durchflußzytometrisch auf die Oberflächenexpression des murinen EDG6-*myc* hin untersucht worden. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 4.42 dargestellt. Wie deutlich zu sehen ist, bewirkt die Stimulierung des murinen EDG6-Rezeptors mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P) in HEK293-Zellen innerhalb von Minuten eine Herunterregulierung der EDG6-Oberflächenexpression, die nach etwa 45min ihren tiefsten Wert erreicht. Diese Herunterregulierung der Oberflächenexpression ist S1P-spezifisch und kann nicht durch andere

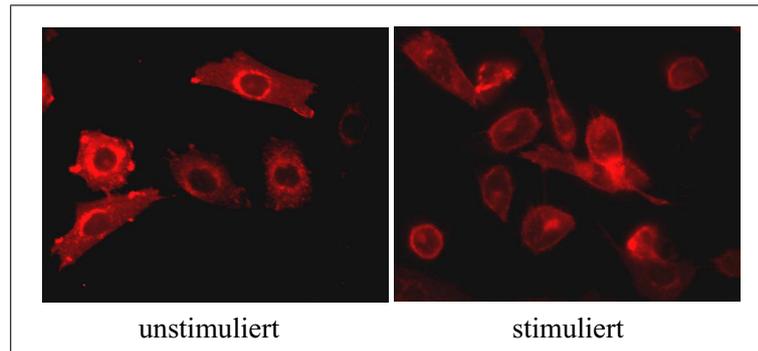


Abbildung 4.43: Immunfluoreszenzfärbung von permeabilisierten stabil humanen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) überexprimierenden CHO-K1-Zellen (Abb. 4.28) mit dem anti-*myc*-Epitop Antikörper 9E10. Die Stimulierung der Zellen erfolgte für 20min mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P).

Lipidderivate wie Lysophosphatidylsäure (LPA) induziert werden (Abb. 4.42). Desweiteren hatte eine zweistündige Vorbehandlung der Zellen mit 100ng/ml Pertussistoxin keine Auswirkungen auf den Internalisierungsprozeß gehabt, so daß die Herunterregulierung der Oberflächenexpression von der $G_{\alpha i}$ -Untereinheit trimärer G-Proteine unabhängig ist. Die Internalisierung konnte ebenfalls nicht durch eine 30-minütige Einwirkung der drei spezifischen Antikörper gegen den murinen EDG6-Rezeptor 8B4-1-1, 2A1-1-1 und 6D7-1 induziert werden (Daten nicht gezeigt).

4.12.2 Stimulierungsabhängige Oberflächenexpression auf CHO-K1-Zellen

Ein Indiz für eine komplexere Oberflächenregulation ergab die Immunfluoreszenzfärbung der permeabilisierten stabil humanen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) überexprimierenden CHO-K1-Zellen (Abb. 4.28) mit Hilfe des anti-*myc*-Epitop Antikörpers 9E10. Wie Abb. 4.43 deutlich zeigt, befindet sich ein Großteil der Rezeptormoleküle in unstimulierten EDG6-*myc* überexprimierenden CHO-K1-Zellen intrazellulär und nicht auf der Zelloberfläche. Die intensivste Färbung der Zellen befindet sich im perinukleären Raum, wobei für eine genaue Lokalisation zusätzliche Marker für die in Frage kommenden Zellorganelle benötigt werden. Nach 20-minütiger Stimulierung der Zellen mit $1\mu\text{M}$ Sphingosin-1-phosphat (S1P) hingegen ist die intensivste Färbung auf der Oberfläche der Zellen auszumachen (Abb. 4.43). Die Stimulierung der EDG6-*myc* überexprimierenden CHO-K1-Zellen mit S1P führt im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den transient murinen EDG6-*myc*-Rezeptor transfizierten HEK293-Zellen nicht zu einer Rezeptorinternalisierung, sondern offensichtlich zu einer erhöhten Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche.

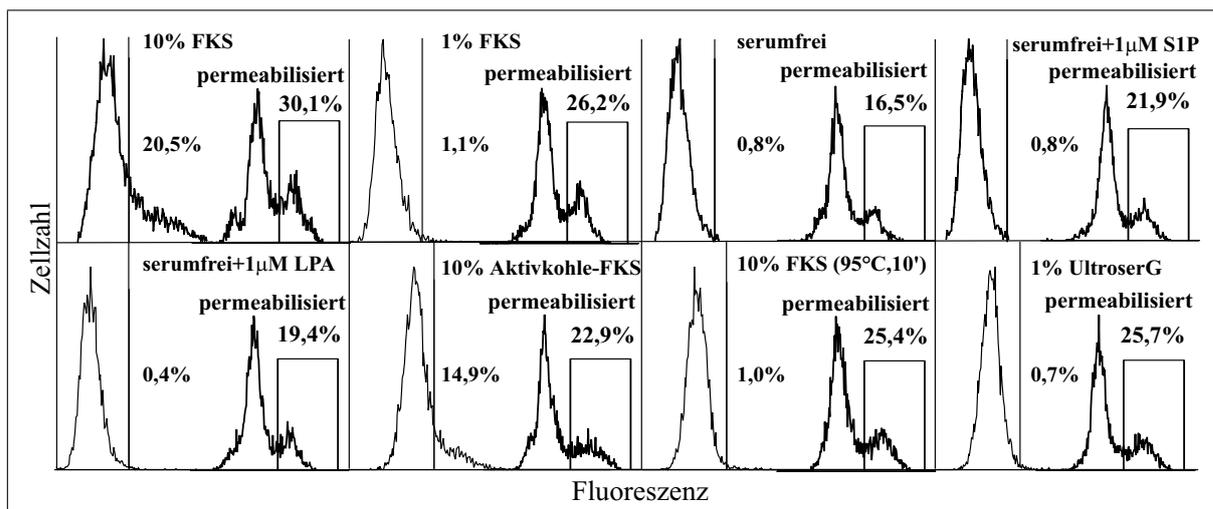


Abbildung 4.44: Bestimmung der Oberflächenexpression des murinen C-terminal *myc*-Epitop-markierten EDG6-Rezeptors (EDG6-*myc*) auf transient transfizierten HeLa-Zellen mit dem spezifischen anti-murinen-EDG6-Rezeptor Antikörper 2A1-1-1 nach Wachstum über Nacht mit 10% FKS, 1% FKS, serumfrei, serumfrei inklusive 1 μ M Sphingosin-1-phosphat (S1P) oder 1 μ M Lysophosphatidylsäure (LPA), 10% Aktivkohle-gefiltertem FKS, 10% aufgekochtem FKS (10min, 95°C) und 1% des Serumersatzes UltrosorG (Gibco). Links ist jeweils die Oberflächenexpression, rechts die Expression nach Permeabilisierung der Zellen abgebildet. Die Anzahl der murinen EDG6-*myc* exprimierenden Zellen ist in Prozent wiedergegeben.

4.12.3 Differentielle Oberflächenexpression auf HeLa-Zellen

Auf HeLa-Zellen unterscheidet sich die EDG6-Oberflächenexpression vollständig von den bisher beschriebenen Beobachtungen auf transient mit murinem C-terminal *myc*-Epitop-markiertem EDG6-Rezeptor (EDG6-*myc*) transfizierten HEK293-Zellen (Abb. 4.42) und stabil humanen EDG6-*myc* überexprimierenden CHO-K1-Zellen (Abb. 4.43). Wie in Abb. 4.44 zu sehen ist, wird der murine EDG6-*myc*-Rezeptor (Kap. 4.6.3) auf der Oberfläche von transient transfizierten HeLa-Zellen exprimiert, die über Nacht in 10% FKS gewachsen sind. Läßt man die Zellen jedoch über Nacht serumfrei oder lediglich bei 1% Serum wachsen, ist mit den spezifischen anti-murinen-EDG6-Rezeptor Antikörpern 8B4-1-1, 2A1-1-1 und 6D7-1 kein Signal mehr auf der Oberfläche der HeLa-Zellen zu detektieren, allerdings erhält man ein gleichwertiges Signal wie bei 10% FKS nach Permeabilisierung, was darauf hindeutet, daß der EDG6-Rezeptor zwar noch in gleichem Maße wie beim Wachstum mit 10% Serum exprimiert, aber nicht mehr an die Zelloberfläche befördert wird. Die Lipidderivate Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Lysophosphatidylsäure (LPA) haben kein Einfluß auf dieses Verhalten (Abb. 4.44). Filtert man die Lipidbestandteile des Serums mit Aktivkohle heraus, ist ebenfalls kein Unterschied im Expressi-

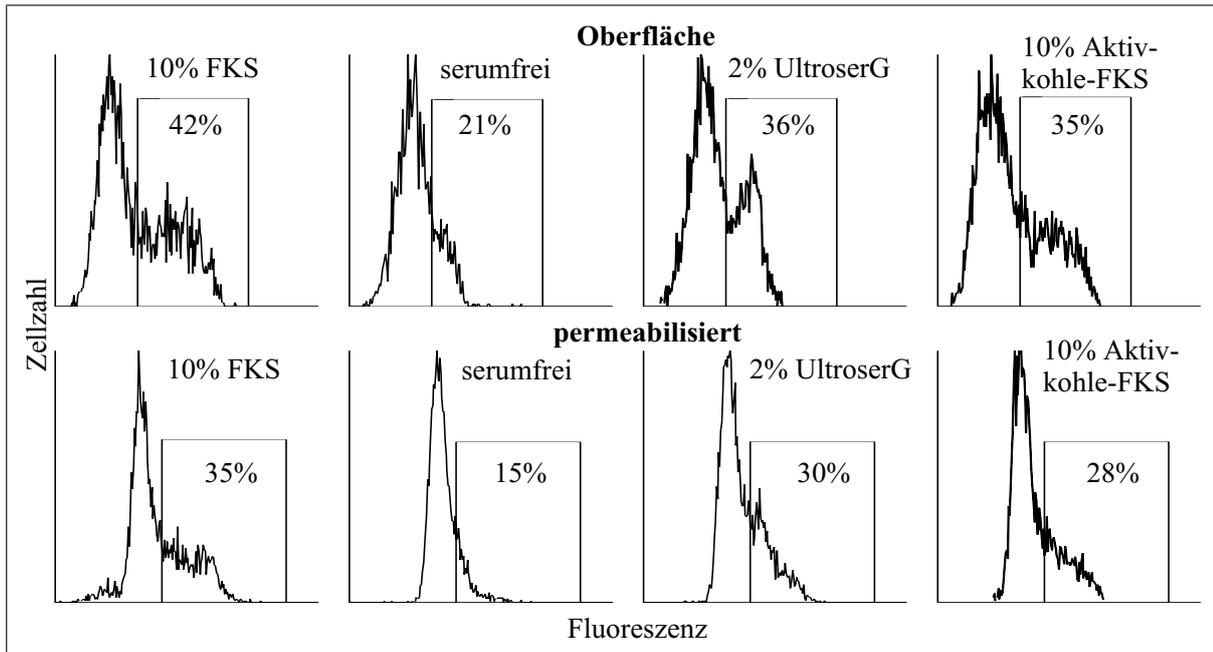


Abbildung 4.45: Bestimmung der Oberflächenexpression des murinen N-terminal HA-Epitop-markierten EDG6-Rezeptors (HA-EDG6) auf transient transfizierten HeLa-Zellen mit dem spezifischen anti-HA-Epitop Antikörper 3F10 nach Wachstum über Nacht mit 10% FKS, serumfrei, 2% des Serumersatzes UltrosorG (Gibco) und 10% Aktivkohle-gefiltertem FKS. Oben ist jeweils die Oberflächenexpression, unten die Expression nach Permeabilisierung der Zellen abgebildet. Die Anzahl der murinen HA-EDG6 exprimierenden Zellen ist in Prozent wiedergegeben.

onsverhalten festzustellen, so daß offensichtlich kein Lipidderivat im Serum für die differentielle Oberflächenexpression des murinen EDG6-Rezeptors verantwortlich ist. Kocht man das Serum hingegen für 10min bei 95°C auf, wird der murine EDG6-Rezeptor nicht mehr an die Oberfläche befördert, was darauf hindeutet, daß ein unbekanntes Hitze-instabiles Serumprotein für den Transport des murinen EDG6-Rezeptors an die Oberfläche der HeLa-Zellen verantwortlich ist. Dieses unbekannte Serumprotein scheint auch in dem Serumersatz UltrosorG (Gibco) zu fehlen, da auch bei Zugabe dieses Serumersatzes keine Oberflächenexpression feststellbar ist (Abb. 4.44). Das murine EDG6-*myc* ist bereits 15min nach Zugabe von 10% FKS zum serumfreien Medium wieder auf der Zelloberfläche zu detektieren.

4.12.4 Oberflächenexpression des N-terminal Epitop-markierten EDG6-Rezeptors

Anders als bei dem C-terminal *myc*-Epitop-markierten murinen EDG6-Rezeptor war der N-terminal Hämagglutinin-(HA)-Epitop-markierte murine EDG6-Rezeptor unabhängig von der Serumzugabe auf der Oberfläche der transient transfizierten HeLa-Zellen zu detektieren

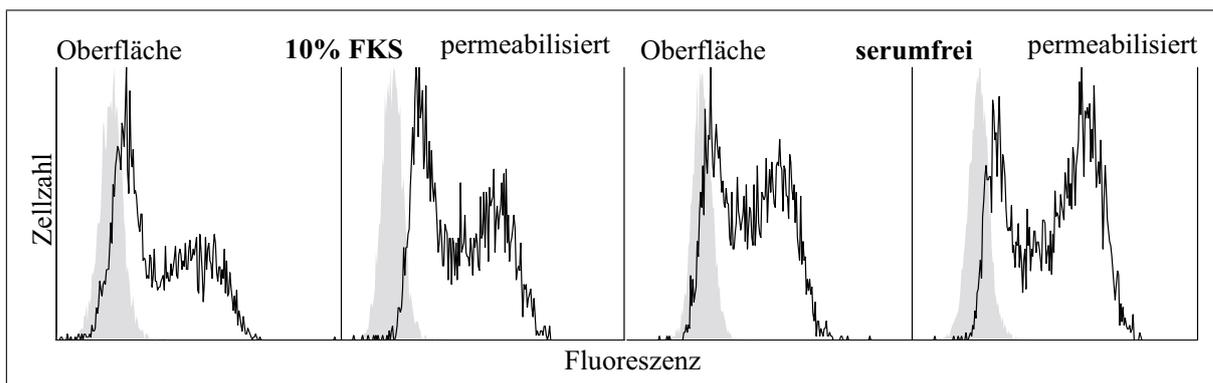


Abbildung 4.46: Bestimmung der Oberflächenexpression des humanen N-terminal HA-Epitop-markierten EDG6-Rezeptors (HA-EDG6) auf transient transfizierten HeLa-Zellen mit dem spezifischen anti-HA-Epitop Antikörper 3F10 nach Wachstum über Nacht mit 10% FKS und serumfrei. Detektiert wurde das HA-Epitop sowohl auf der Zelloberfläche, als auch in permeabilisierten HeLa-Zellen. Als grau unterlegte Kontrollen sind Zellen ohne Antikörperbehandlung gezeigt.

(Abb. 4.45). Für diesen Versuch wurde der N-terminal HA-Epitop-markierte murine EDG6-Rezeptor im pRC/CMV-Vektor (HA-EDG6, Kap. 4.7.1) transient in HeLa-Zellen transfiziert und unter den in Kap. 4.12.3 bereits beschriebenen Bedingungen durchflußzytometrisch analysiert (Kap. 3.20). Wie in Abb. 4.45 zu sehen ist, konnte der murine HA-EDG6-Rezeptor mit dem anti-HA-Epitop Antikörper 3F10 unter allen Bedingungen auf der Oberfläche detektiert werden. Somit ist durch das N-terminal angehängte HA-Epitop die in Kap. 4.12.3 beschriebene differentielle Oberflächenexpression außer Kraft gesetzt. Die Oberflächenexpression des murinen HA-EDG6-Rezeptors findet nicht nur bei Kultivierung der Zellen in 10% FKS und 10% Aktivkohle-gefiltertem lipidfreiem FKS statt, sondern auch bei serumfreiem Wachstum sowie bei Kultivierung in 2% des Serumersatzes UltrosorG (Gibco) (Abb. 4.45). Auch der humane HA-EDG6-Rezeptor (Kap. 4.5) ist sowohl bei serumfreiem Wachstum, als auch bei Kultivierung in 10% FKS auf der Oberfläche von transient transfizierten HeLa-Zellen zu detektieren (Abb. 4.46).

Die Beobachtungen bezüglich der EDG6-Oberflächenexpression zeigen, daß in CHO-K1-Zellen Sphingosin-1-phosphat, in HeLa-Zellen ein unbekanntes Hitze-instabiles Serumprotein den Transport des EDG6-Rezeptors an die Oberfläche induzieren können. Dieser zellspezifische differentielle Oberflächentransport findet nicht bei N-terminal Hämagglutinin-markierten EDG6-Rezeptorkonstrukten statt, da die N-terminale Markierung zu einer konstitutiven Oberflächenexpression von EDG6 führt.

