

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

Dissertation

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor EDG6

Markus Gräler

September 2000

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

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

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

Markus Gräler

Berlin, im September 2000

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

Datum der Disputation: 19. Januar 2001

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

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

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

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

„Nichts schockiert mich, ich bin Wissenschaftler!“

Indiana Jones

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

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

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

Abbildungsverzeichnis

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

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

6 Zusammenfassung

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

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

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

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

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

7 Summary

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

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

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

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

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

9 Abkürzungsverzeichnis

Symbole für Aminosäuren

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

Physikalische Maßeinheiten

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

Vorangestellte Größenbezeichnungen

f	femto	p	piko
n	nano	μ	mikro
m	milli	k	kilo

Symbole für Nukleotide

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

Sonstige Abkürzungen:

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

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

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

10 Danksagung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lebenslauf

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

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

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

