

**Der hS1P₅-Rezeptor und der hGPR63:
Identifizierung
und
Charakterisierung
von zwei neuen S1P-Rezeptoren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Anke Niedernberg
aus Frankfurt

Frankfurt 2002
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Walter E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Andreas E. Busch

Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler

Datum der Disputation:

21. Januar 2003

Abkürzungen und Einheiten

[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläres Calcium
AccNo	Accession Nummer
AMV-RT	avian myeloblastis virus reverse transcriptase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA-FAF	Rinderserumalbumin, fettsäurefrei (engl.: <i>fatty acid free</i>)
Cam	Chloramphenicol
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO-K1-Zellen	<i>Chinese-hamster-ovary</i> -Zellen
COS-7-Zellen	Mutierte CV-1-Zelle
cpm	Zähler pro Minute (<i>counts per minute</i>)
Da	Dalton (molekulare Masse)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
dhS1P	Dihydrosphingosin-1-phosphat
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Didesoxyribonukleotid-5'-triphosphat
doPA	Dioleoyl-Phosphatidsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
edg	<i>endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
FCS, csFCS	Fötales Kälberserum, aktivkohlebehandeltes FCS (engl. : <i>charcoal stripped</i>)
FLIPR	<u>F</u> luorescence <u>I</u> maging <u>P</u> late <u>R</u> eader
GDP	Guanosindiphosphat
GFP, EGFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl.: <i>green fluorescent protein</i>), enhanced GFP
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosin-Nukleotid-bindendes-Protein

GTP	Guanosintriphosphat
HAOEC	Humane Endothelzellen der Aorta
HAOSMC	Humane glatte Muskelzellen der Aorta
HCAEC	Humane Endothelzellen der Koronararterie
HCASMC	Humane glatte Muskelzellen der Koronararterie
HEK293	Humane embryonische Nierenzellen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HMVEC-L	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge
HPAEC	Humane Endothelzellen der Pulmonararterie
HPASMC	Humane glatte Muskelzellen der Pulmonararterie
HUVEC	Humane Endothelzellen der Nabelschnur
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPA	Lysophosphatidsäure
LPL	Lysophospholipide
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein (<i>Mitogen activated protein</i>)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMLV-RT	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NF023	8,8`-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylen))bis-(1,3,5-naphtalentrissulfonsäure
NT	Neurotensin
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PA	Phosphatidsäure
PAF	Plättchen-aggregierender Faktor
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> ele <u>l</u> ektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA, PKC, PKN	Proteinkinase A , C oder N
PLC	Phospholipase C
PSC	<i>Peak stable cells</i>

PTX	Pertussis-Toxin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPA	<i>scintillation proximity assay</i>
SPC	Sphingosylphosphorylchlorid
SphK	Sphingosinkinase
SRE	<i>Serum response element</i>
TAE	TRIS-Azetat-EDTA-Lösung
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung (<i>TRIS buffered saline</i>)
TKR	Thymidinkinase Renilla
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

Meinen Eltern gewidmet

1	EINLEITUNG	4
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	4
1.1.1	Struktur von GPCRs und Signaltransduktion	5
1.1.2	<i>Orphan</i> -GPCRs	9
1.1.3	Konstitutiv aktive GPCR's	11
1.1.4	GPCRs in der Therapie	12
1.2	Die Lipide LPA und S1P	13
1.2.1	Struktur, Vorkommen sowie Bildung und Abbau	14
1.2.2	Zelluläre und physiologische Effekte	17
1.2.3	Die LPA- und S1P-Rezeptoren	19
1.3	Ziel dieser Arbeit	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Molekularbiologische Methoden	23
2.1.1	Gewinnung von Plasmid-DNA	23
2.1.1.1	Transformation mittels Hitzeschock	23
2.1.1.2	Minipräparation	24
2.1.1.3	Maxipräparation	24
2.1.2	Quantitative und qualitative Analyse von Nukleinsäuren	25
2.1.2.1	Photometrische Analyse von Nukleinsäuren	25
2.1.2.2	Sequenzanalyse von DNA	26
2.1.2.3	Restriktionsverdau	27
2.1.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.1.3	DNA-Reinigung	27
2.1.3.1	Ethanol-fällung	28
2.1.3.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.1.3.3	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI-Extraktion)	28
2.1.4	Isolierung von RNA	29
2.1.4.1	Isolierung von RNA aus Zelllysaten	29
2.1.4.2	Isolierung von RNA aus tierischen Organen	29
2.1.5	Northern Blot	31
2.1.5.1	Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden	32
2.1.5.2	Tüpfeltest	32
2.1.5.3	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	34
2.1.5.4	Kapillarblot	34
2.1.5.5	Hybridisierung, Waschen und Detektion	35
2.1.5.6	Sondenentfernung (Strippen)	36
2.1.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.1.6.1	PCR mit der Taq-Polymerase	37
2.1.6.2	PCR mit dem GC-Melt-Kit	38
2.1.6.3	PCR mit der Pfu-Polymerase	38
2.1.6.4	Echt-Zeit-PCR	39
2.1.7	Synthese von cDNA aus RNA mittels RT-Reaktion	42
2.1.8	Klonierung und Subklonierung, Ligation	43
2.2	Zellbiologische Methoden	46
2.2.1	Zellkultur immortalisierter Zellen	46
2.2.1.1	Kultivierung und Passage	46
2.2.1.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen	47
2.2.2	Transfektion von Säugerzellen	47
2.2.2.1	Transiente Transfektion	47
2.2.2.2	Transfektion zur Herstellung stabiler Zelllinien	48
2.2.3	Funktionelle Versuche	49
2.2.3.1	Bestimmung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration mit dem FLIPR [®]	49
2.2.3.2	Bestimmung der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration mittels CHO5A- Zellen	51
2.2.3.3	Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration	51

2.2.3.4	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsversuche	53
2.2.3.5	Rho-Aktivierung	55
2.2.3.6	ERK in-vitro-Kinase-Reaktion	56
2.2.4	Proliferationsversuche	56
2.2.5	Morphologische Veränderung bei Zellen	56
2.2.6	Internalisierungsversuche	57
2.2.7	Apoptosebestimmung	57
2.2.7.1	DAPI-Färbung	57
2.2.7.2	Caspasemessung	57
2.3	Biochemische Methoden	58
2.3.1	Membranpräparation	58
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	59
2.3.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	59
2.3.4	Western Blot	60
2.4	Analytische und bioinformatische Methoden	61
2.4.1	HPLC-MS-Analyse	61
2.4.2	Bioinformatik	62
2.5	Auswertung, Statistik und graphische Bildbearbeitung	62
Materialien		63
3	ERGEBNISSE	68
3.1	Der S1P₅-Rezeptor und die LPA/S1P-Rezeptor-Familie	68
3.1.1	Bioinformatische Grundlagen	68
3.1.1.1	Identifizierung und Klonierung des humanen S1P ₅ -Rezeptors	68
3.1.1.2	Der orphan-Rezeptor S1P ₅ im Familienkontext	69
3.1.2	Expressionsprofile	72
3.1.2.1	Expression der humanen LPA/S1P-Rezeptoren in Herz-Kreislauf-relevanten Geweben	73
3.1.2.2	Expressionsprofile der LPA/S1P-Rezeptoren in Endothelzellen und glatten Muskelzellen	75
3.1.2.3	Die Gewebeverteilung des humanen und Ratten-S1P ₅ -Rezeptors	76
3.1.3	Agonisten- und Antagonistenidentifizierung	78
3.1.3.1	Screenen von 201 bioaktiven Lipiden	80
3.1.3.2	Allosterische Effekte auf den hS1P ₅ - und rS1P ₅ -Rezeptor	83
3.1.3.3	Inhibitorische Effekte von Suramin und NF023 am humanen und rS1P ₅ -Rezeptor	86
3.1.4	Funktionelle Untersuchungen am humanen S1P ₅ -Rezeptor	88
3.1.4.1	GTPγS-Versuche	88
3.1.4.2	cAMP-Versuche	93
3.1.4.3	Rho-Signaltransduktionsweg	96
3.1.4.4	ERK-Phosphorylierung	98
3.1.4.5	Gβ/γ-vermittelte [Ca ²⁺] _i -Freisetzung; Bestimmung mittels Aequorin	99
3.1.5	Effekte des hS1P ₅ -Rezeptors bei Zellexpression	101
3.1.5.1	Effekte auf die Zellmorphologie	101
3.1.5.2	Effekte auf die Zellproliferation	102
3.1.5.3	Apoptoseinduktion	103
3.1.5.4	Rezeptorinternalisierung	105
3.2	Der humane GPR63	108
3.2.1	Bioinformatische Grundlagen	108
3.2.1.1	Klonierung des hGPR63 aus genomischer DNA	109
3.2.2	Ligandenidentifizierung des hGPR63 und hGPR45	110
3.2.2.1	Bestimmung der Lipid-induzierten [Ca ²⁺] _i -Freisetzung durch den hGPR63 und den hGPR45 mittels FLIPR-Technologie	110
3.2.2.2	Bestimmung der Lipid-induzierten [Ca ²⁺] _i -Freisetzung via hGPR63 in CHO-K1-Zellen mittels Aequorin	114
3.2.3	Expressionsprofile des hGPR63 und des hGPR45	116

3.2.3.1	Expression des hGPR63 und hGPR45 in Herz-Kreislauf-relevanten Geweben sowie Hirn und Lunge	116
3.2.3.2	Expression in Endothelzellen, glatten Muskelzellen sowie HEK293-Zellen	117
3.2.3.3	Quantitative Expressionsanalyse des hGPR63 in humanen Geweben sowie verschiedenen Hirnregionen mittels TaqMan	119
3.2.4	Weitere Untersuchungen zu S1P-induzierten Effekten mit dem hGPR63	120
3.2.4.1	Effekte des hGPR63 auf die Zellproliferation	120
3.2.4.2	cAMP-, GTP γ S-, Rho-Aktivierungsversuche	122
4	DISKUSSION	123
4.1	Der humane S1P₅-Rezeptor und der humane GPR63: zwei neue S1P-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität.	123
4.1.1	Der fünfte hochaffine humane S1P-Rezeptor	123
4.1.2	Der S1P ₅ -Rezeptor des Menschen und der Ratte: Homolog, aber doch verschieden?	132
4.1.3	Der hGPR63 - ein S1P-Rezeptor mit niedriger Affinität	135
4.2	Die konstitutive Aktivität des S1P₅-Rezeptors bei verschiedenen zellulären Effekten	139
4.3	Ausblick	145
5	ZUSAMMENFASSUNG	147
6	ANHANG	149
6.1	Anhang A: Proteinsequenzvergleich der S1P₅-Rezeptoren von Maus, Mensch und Ratte	149
6.2	Anhang B: Nukleotid- und Proteinsequenz des hGPR63	150
6.3	Anhang C: Zusammensetzung der Lipid-Substanz-Bibliothek	152
6.4	Anhang D: Strukturformeln ausgewählter Lipide	157
6.5	Anhang E: Massenspektren ausgewählter Lipide nach HPLC- Analyse	159
6.6	Anhang F: Strukturformeln von Suramin und NF023	166
7	LITERATURVERZEICHNIS	167
8	VERÖFFENTLICHUNGEN UND PATENTE	186
9	DANKSAGUNG	187
10	LEBENS LAUF	188

1 Einleitung

Zellmembranen bestehen aus einer Doppelschicht von Lipidmolekülen, die für die meisten Substanzen und Ionen undurchlässig ist. Um dennoch einen Informationsaustausch zwischen den extrazellulären und den intrazellulären Regionen gewährleisten zu können, stehen den Organismen mehrere Mechanismen zur Verfügung. Neben Ionenkanälen und Transportern, die für einen Austausch von Substanzen oder Ionen zwischen dem Zellinneren und dem Extrazellulärraum sorgen, spielen hier vor allem G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs; G-Protein: Guanosin-bindendes-Protein) eine entscheidende Rolle.

In diesem Kapitel wird ein allgemeiner Überblick über GPCRs sowie eine Einführung in die Familie der Lipidrezeptoren gegeben. Der erste Teil erläutert die generelle Struktur der GPCRs und das Prinzip der Signalübertragung und erklärt die Bedeutung von konstitutiver Aktivität und *orphan*-GPCRs. Im zweiten Teil werden die Lipide Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA) sowie die zu Beginn dieser Arbeit bekannten Rezeptoren dieser Lipide dargestellt.

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

GPCRs finden sich in allen Organismen, bei Tieren, Pflanzen, Bakterien und beim Menschen. Sie gehören zur größten Superfamilie von membranständigen Proteinen, die für die Vermittlung von diversen extrazellulären Stimuli, wie Licht (Shichida et al., 1998), Ca^{2+} (Ruat et al., 1995), Gerüchen (Touhara et al., 1999), Aminosäuren (Nguyen et al., 2001), Peptiden (Liu et al., 1999), Fettsäurederivaten (Chun, 1998) und verschiedenen Polypeptidliganden (Shetzline et al., 2002) verantwortlich sind. Generell kommt es nach Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden zu Konformationsänderungen des Proteins, wodurch im Anschluss intrazellulär G-Proteine aktiviert werden. Diese induzieren dann im Zellinneren diverse Ereignisse, die die Zellfunktion regulieren.

Man unterteilt GPCRs nochmals in drei Untergruppen, die wiederum aus unterschiedlichen Familien bestehen. Einen tabellarischen Überblick mit ausgewählten Beispielen gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Gruppierung von GPCRs anhand ihrer Struktur. Eine Gruppe beinhaltet Rezeptoren mit einer Sequenzhomologie von mehr als 20%, die wahrscheinlich evolutionär den gleichen Ursprung haben. Eine Familie beinhaltet Rezeptoren mit gemeinsamen, biochemischen Eigenschaften. Modifiziert nach Flower (1999).

Gruppe A: Rhodopsin-ähnlich	
Familie I	Adenosin-, Melanocortin-, Olfaktorische Rezeptoren
Familie II	Rezeptoren für biogene Amine (z.B. β_2 Adrenozeptor)
Familie III	Opsine und Neuropeptid-Rezeptoren von Wirbeltieren
Familie IV	Opsine von Nicht-Wirbeltieren
Familie V	Chemokin-, Chemotaktische-, Somatostatin-, Opioid-Rezeptoren
Familie VI	Melatoninrezeptoren
Gruppe B: Calcitonin-Ähnlich	
Familie I	Calcitonin-, Calcitonin-like- und CRF-Rezeptoren
Familie II	PTH/PTHrP-Rezeptoren
Familie III	Glucagon- und Sekretin-Rezeptoren
Familie IV	Latrotoxin-Rezeptoren
Gruppe C: Metabotrope Glutamat-Rezeptoren u.ä.	
Familie I	Metabotrope Glutamat-Rezeptoren
Familie II	Calcium-Rezeptoren
Familie III	GABA-B-Rezeptoren
Familie IV	Putative Pheromon-Rezeptoren
Gruppe D:	STE2-Pheromon-Rezeptoren
Gruppe E:	STE3-Pheromon-Rezeptoren
Gruppe F:	cAMP-Rezeptoren

Man kennt zur Zeit ca. 300 Sequenzen potentieller GPCRs; davon sind ca. $\frac{2}{3}$ Rezeptoren mit bekannten Liganden (hiervon binden einige Liganden an mehrere Rezeptoren), der Rest zählt zu den *orphan*-Rezeptoren (siehe Abschnitt 1.1.2), deren Liganden noch unbekannt sind.

1.1.1 Struktur von GPCRs und Signaltransduktion

GPCRs zeichnen sich durch sieben hydrophobe transmembranäre α -Helices (H-I – H-VII) aus, wobei der N-Terminus im Extrazellulärraum, der C-Terminus intrazellulär (im Zytoplasma) lokalisiert ist. Diese Helices sind über drei extrazelluläre (E-I - E-III) und drei intrazelluläre (C-I – C-III) Schleifen miteinander verbunden. Einige der strukturellen Gemeinsamkeiten auf Aminosäureebene werden hier exemplarisch anhand des Rhodopsin-Rezeptors, dessen dreidimensionale Struktur vor kurzem von Palczweski et al. (2000) aufgeklärt worden ist, erläutert (siehe Abbildung 1).

In den beiden ersten extrazellulären Schleifen (E-I und E-II) befinden sich zwei konservierte (in den meisten Rezeptoren vorhandene) Cysteine (Aminosäure C), die über die Ausbildung von Disulfidbrücken für die Stabilität des Rezeptors verantwortlich sind. Eine Triplet-Sequenz (meistens DRY, im Falle des Rhodopsin-Rezeptors ERY) befindet sich am Ende der dritten transmembranären Region. Diese wird mit der Interaktion mit den G-Proteinen in Verbindung gebracht. Ein weiteres, hoch konserviertes Motiv ist das NPXXY-Motiv in H-VII. Des weiteren treten im N-terminalen extrazellulären Bereich N-terminale Glykosylierungsseiten auf, während die Phosphorylierungs- und Palmitoylierungssequenzen in der intrazellulären C-terminalen Domäne lokalisiert sind. Letztere sind stark in die Signaltransduktion sowie das „Rezeptortrafficking“ – das Transportieren des aktivierten membranständigen Rezeptors ins Zellinnere mittels Endozytose zum Abschalten des Rezeptors - involviert.

Im Gegensatz dazu ist die dritte intrazelluläre Schleife (C-III) dafür bekannt, starke strukturelle Unterschiede in den verschiedenen GPCRs aufzuweisen und damit für die Spezifität der G-Protein-Aktivierung verantwortlich zu sein.

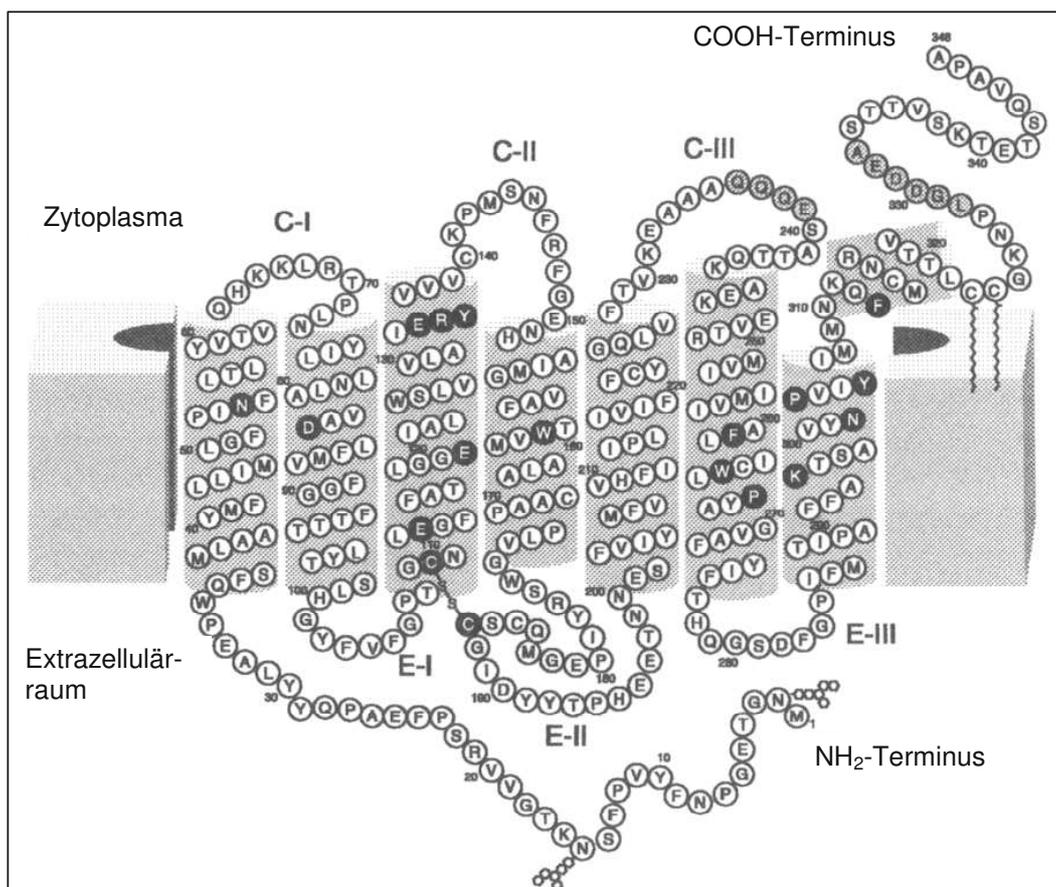


Abbildung 1: **2-dimensionale Struktur des Rhodopsin-Rezeptors.** Modifiziert nach Palczewski et al. (2000).

Wie der Name vermuten lässt, erfolgt die Signaltransduktion, das Weiterleiten eines Signals aus dem extrazellulären in den intrazellulären Raum, durch Aktivierung von G-Proteinen. Diese verbinden den Rezeptor mit intrazellulären Effektoren. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, der α -, β - und der γ -Untereinheit. Im Ruhezustand sind diese Untereinheiten miteinander verbunden, die β/γ -Untereinheit sorgt für die Verankerung des G-Proteins in der Membran, die α -Untereinheit ist an ein Guanosindiphosphat-Molekül (GDP-Molekül) gebunden (Abbildung 2). Wird der Rezeptor von einem Liganden aktiviert, verändert er seine dreidimensionale Struktur. Das G-Protein assoziiert daraufhin mit dem Rezeptor, und durch die Komplexbildung kommt es zur Aktivierung des G-Proteins: Während die β/γ -Untereinheit zusammenbleibt und direkt ihre Effekte vermittelt, kommt es bei der α -Untereinheit zunächst zum Austausch von GDP durch Guanosintriphosphat (GTP). Diese aktivierte α -Untereinheit schaltet im Folgenden die intrazellulären Signaltransduktionswege an.

Zur Zeit sind sechs strukturell verschiedene β -Untereinheiten und 12 γ -Untereinheiten bekannt; die in Abbildung 2 dargestellten Effekte der β/γ -Untereinheit, wie z. B. die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) oder von Ionenkanälen, werden jedoch keiner speziellen Isoform zugeordnet. Demgegenüber teilen sich die α -Untereinheiten in vier Hauptklassen auf: $G\alpha_i$, $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$. Diese G-Protein- α -Untereinheiten werden weiter in Subklassen unterteilt - zur Zeit sind insgesamt 16 verschiedene α -Subklassen bekannt-, auf die hier jedoch nicht im Detail eingegangen werden soll. Das gleiche gilt für die primär im Hirn vorhandene $G\alpha$ -Untereinheit $G\alpha_o$ sowie Transducin, welches am Sehprozess beteiligt ist und nur im visuellen System vorkommt. Abbildung 2 zeigt schematisch die Signaltransduktion mittels eines GPCRs von der Aktivierung des Rezeptors bis zur intrazellulären Signaltransduktion und zur Gentranskription im Zellkern. Die Haupteffekte der vier G-Protein- α -Untereinheiten seien hier kurz erwähnt, weitere sind aus Abbildung 2 ablesbar. Über $G\alpha_i$ wird die Hemmung der Adenylatzyklase bewirkt. Da dieses Enzym für die Bildung von cAMP zuständig ist, wird hierdurch die cAMP-Konzentration gesenkt. Den entgegengesetzten Effekt hat $G\alpha_s$, wobei es hier durch Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Steigerung der cAMP-Spiegel kommt. Nach Aktivierung von $G\alpha_q$ erfolgt u.a. die Aktivierung von PLC- β und anschließend die Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) und Ca^{2+} . $G\alpha_{12/13}$ ist primär in Rho-vermittelte Effekte involviert.

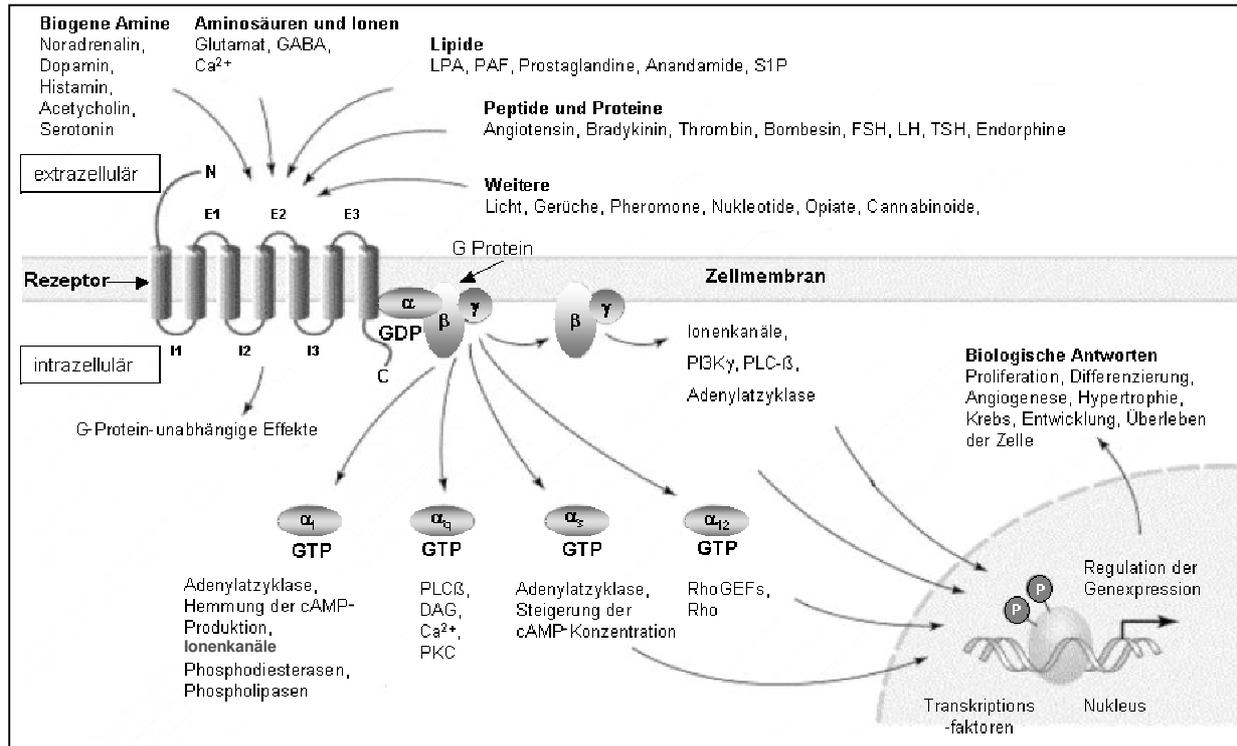


Abbildung 2: **Diversität von GPCRs.** Ein breites Spektrum an Liganden (biogenen Aminen, Aminosäuren, Ionen, Lipiden, Proteinen) vermittelt seine Signale über GPCR- und anschließende G-Protein-Aktivierung bzw. nur über den GPCR. Die aktivierten Signaltransduktionswege regulieren zentrale biologische Funktionen wie Zellproliferation und Angiogenese. DAG: Diacylglycerol; FSH: Follikel-stimulierendes Hormon; GEF: Guanin-Nukleotid Austauschfaktor; LH: Luteinisierendes Hormon; LPA: Lysophosphatidsäure; PAF: Plättchen-aggregierender Faktor; PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; S1P: Sphingosin-1-Phosphat; TSH: Thyreotropin. Modifiziert nach Marinissen & Gutkind (2001).

Die Abschaltung der G α -Untereinheit erfolgt durch Abspaltung eines Phosphates vom GTP. Die an GDP gebundene G α -Untereinheit verbindet sich dann wieder mit der β/γ -Untereinheit zum inaktiven Heterotrimer.

Welche α -Untereinheit mit welchen β/γ -Untereinheiten unter welchen Umständen ein heterotrimeres G-Protein bildet, ist noch nicht geklärt (siehe auch Hildebrandt, 1997). Aufgrund der immensen Kombinationsmöglichkeiten von verschiedenen Untereinheiten sowie der Tatsache, dass ein Rezeptor in Abhängigkeit von Ligand oder Zelle auch in der Lage sein kann, mehrere G α -Untereinheiten zu aktivieren, ist eine genaue Vorhersage der angeschalteten Signaltransduktionswege sowie der Effekte, die ein neu entdeckter Rezeptor bewirken kann, zur Zeit so gut wie unmöglich.

Das Abschalten eines GPCRs erfolgt zunächst durch Phosphorylierung des Rezeptors durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) und der anschließenden Bindung des Adapterproteins β -Arrestin (siehe Abbildung 3). Letzteres sorgt nicht nur für die Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein, zusätzlich ermöglicht die Bildung dieses Komplexes auch die Endozytose des Rezeptors über Clathrin-überzogene Vesikel (Luttrell & Lefkowitz, 2002).

Intrazellulär werden die Rezeptoren dann entweder abgebaut oder nach dem Recyclingprozess zurück zur Zellmembran transportiert. Es sei erwähnt, dass in letzter Zeit ein weiterer Effekt des β -Arrestins beobachtet worden ist. Statt den Rezeptor abzuschalten, kann β -Arrestin eine zweite Signaltransduktionswelle initiieren (siehe Abbildung 3), indem es die Ansammlung von verschiedenen MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen) organisiert und dadurch die Aktivierung von ERK1/2 (Extrazellulär regulierter Kinase) und JNK3 durch den Rezeptor ermöglicht (McDonald & Lefkowitz. 2001).

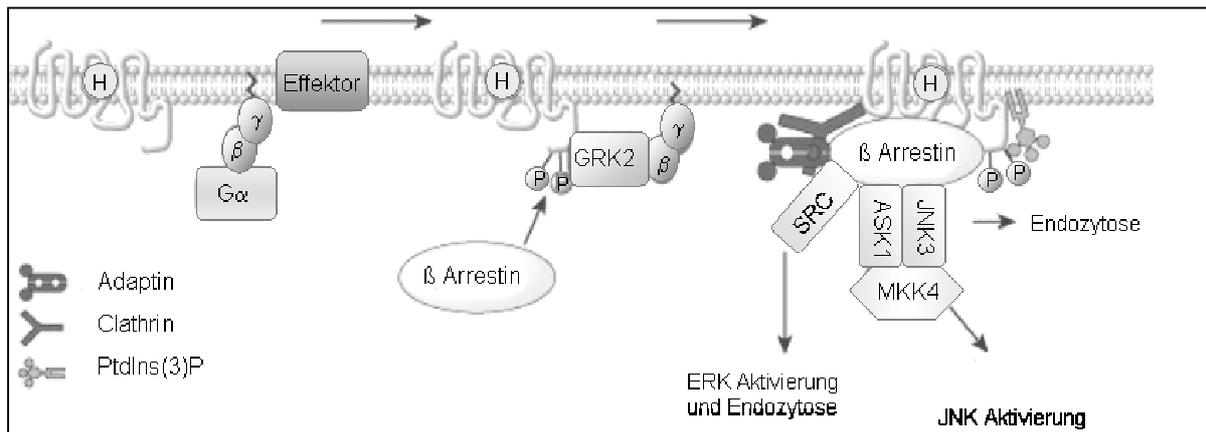


Abbildung 3: Die Rolle des β -Arrestins. Nach Binden des Agonisten (H) an den Rezeptor kommt es zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in eine $G\alpha$ -GTP und eine $G\beta/\gamma$ -Untereinheit, welche den G-Protein-Effektor anschalten. Die $G\beta/\gamma$ -Untereinheit bewirkt u.a. eine verstärkte Phosphorylierung des mit dem Liganden besetzten Rezeptors durch die G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinase (GRK2). Im Anschluss kommt es zum Binden des β -Arrestins an den phosphorylierten Rezeptor. Hierdurch wird nicht nur der Rezeptor vom G-Protein getrennt, sondern zusätzlich bewirkt es das Binden von Clathrin und dem Clathrin-Adapter AP2. Diese bereiten den Rezeptor damit für die Endozytose vor. Des Weiteren kann es durch die Interaktion des β -Arrestins mit SRC zur Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) und zur Endozytose kommen. Bei Interaktion des β -Arrestins mit einer MAP-Kinase-Kinase (z.B. ASK1) und c-Jun-N-terminal-Kinase 3 (JNK3) kommt es zur Anlagerung an eine MAP-Kinase (z.B. MKK), und es erfolgt die Aktivierung des MAPK/JNK3-Komplexes. PtdIns(3)P: Phosphoinositol-3-phosphat. Modifiziert nach Rockman et al. (2002).

1.1.2 Orphan-GPCRs

Orphan-GPCRs - also Waisen der GPCR-Familie - sind Rezeptoren, deren Sequenz schon bekannt ist und die die strukturellen Motive eines GPCRs (siehe Kapitel 1.1.1) aufweisen, denen jedoch noch kein bestimmter physiologischer Ligand zugeordnet werden konnte. Meistens ist die Aminosäuresequenz nur zu maximal 40% identisch zu GPCRs mit bekannten Liganden. Aus diesem Grund kann man diese Rezeptoren nicht zuverlässig schon bekannten Rezeptorunterfamilien zuordnen. Häufig finden sich zwischen den einzelnen

orphan-Rezeptoren allerdings hohe Homologien, die vermuten lassen, dass es sich hierbei um eine Unterfamilie mit einem speziellen, eventuell neuen Liganden handelt. Viele der *orphan*-Rezeptoren wurden bisher nur aus *expressed sequence tags* (ESTs) voraus gesagt - das sind DNA-Bruchstücke, die beim Analysieren des Genoms auftreten und in z.T. öffentlichen Datenbanken zugänglich sind - und müssen noch als Klone in voller Länge kloniert werden. Man geht davon aus, dass nach der kompletten Analyse des humanen Genoms etwa 200-500 *orphan*-GPCRs identifiziert sein werden (Howard et al., 2001). Die Familie der GPCRs und damit insbesondere der *orphan*-GPCRs ist von besonderem Interesse, da im Moment ca. 50% der auf dem Markt befindlichen Medikamente an GPCRs angreifen (siehe Abschnitt 1.1.4) und somit die Identifizierung eines Liganden für einen *orphan*-GPCR die Grundlage für die Entwicklung neuer Arzneistoffe darstellen könnte. Für die Identifizierung von Liganden (*deorphaning*) an *orphan*-Rezeptoren stehen heutzutage mehrere Möglichkeiten zur Verfügung:

- 1) Weist der Rezeptor eine Homologie (ideal wären ca. 40%) zu Rezeptoren mit bekanntem Liganden auf, wird zunächst mit diesem Liganden und strukturell ähnlichen Substanzen gearbeitet. Dieser Ansatz führte u.a. zur Identifizierung des Liganden S1P für den S1P₂-Rezeptor (edg5) und den S1P₃-Rezeptor (edg3) (Okamoto et al., 1999; An et al., 2000) aufgrund der hohen Homologie zum S1P₁-Rezeptor (edg1). Hierbei kann es allerdings auch vorkommen, dass man bei niedriger Homologie zunächst den falschen Weg beschreitet, wie das Beispiel der H₃- und H₄-Histamin-Rezeptoren zeigt. Diese weisen nur eine ca. 20%ige Homologie zu den H₁- und H₂-Rezeptoren auf, alle vier Rezeptoren haben jedoch den gleichen Liganden, das Histamin (Lovenberg et al., 1999; Oda et al., 2000).
- 2) Vergleicht man die Expressionsprofile der Rezeptoren mit denen der vermeintlichen Liganden, können bei hoher Übereinstimmung dieser Parameter Rückschlüsse auf den Liganden möglich werden. Dies führte bei den Rezeptoren RDC7 und RDC8 zur Identifizierung als Adenosinrezeptoren (Maenhaut et al., 1990; Libert et al., 1991).
- 3) Gewebeextrakte können in funktionellen Versuchen mit *orphan*-GPCRs eingesetzt werden und die Liganden durch Fraktionierung, Aufreinigung und molekulare Charakterisierung identifiziert werden. Als Beispiel seien hier die Liganden Nociceptin und das Prolactin-releasing-Hormon angegeben.
- 4) Bekannte Liganden von GPCRs werden zufällig an den Rezeptoren getestet, um einen weiteren Rezeptor für eine bekannte Substanz zu identifizieren.

Hat man den Liganden identifiziert, erfolgt in der Regel die sukzessive Charakterisierung des Rezeptors in der Hoffnung, diesem eine Funktion zuordnen zu können, welche dann u.U. neue Ansätze in der Therapie von Krankheiten mit sich bringt.

Ein wichtiges Werkzeug bei der Untersuchung von *orphan*-GPCRs stellen die verschiedenen G-Protein-Chimären dar. Dies sind G-Protein-Konstrukte, die in der Lage sind, Rezeptoren an einen bestimmten Signaltransduktionsweg zu koppeln, den diese nativ nicht anschalten können. Da für *orphan*-GPCRs noch keine Signaltransduktionswege bekannt sind, kann mit Hilfe dieser G-Proteine ein für den zu untersuchenden Rezeptor eigentlich ungeeignetes Versuchssystem zu einem optimalen Werkzeug umgewandelt werden. So kann z.B. $G\alpha_{16}$ Rezeptoren aller Art an den $G\alpha_q$ -Weg koppeln, $G\alpha_{\Delta 6q/4myr}$ koppelt selektiv Rezeptoren, die nativ über $G\alpha_i$ ihre Signale weiterleiten würden, an den $G\alpha_q$ -Weg (Kostenis, 2002).

1.1.3 Konstitutiv aktive GPCR's

In Anlehnung an das "two state model" können GPCRs spontan ohne Zugabe eines Liganden zwischen einem inaktiven (R) und einem aktiven (R^*) Zustand wechseln (Samama et al., 1993; Weiss et al., 1996). In der aktiven Konformation R^* kommt es zur Kopplung des Rezeptors an G-Proteine und somit zu einer messbaren zellulären oder pharmakologischen Antwort. Bei mehreren GPCRs wurde diese als konstitutive Aktivität bezeichnete Eigenschaft beobachtet, wenn die Rezeptoren in rekombinanten Systemen überexprimiert wurden (Samama et al., 1993; van Sande et al., 1995; Kenakin, 1996; Chen et al., 2000). Sie kann beim Screenen von GPCRs genutzt werden: Liganden, die eine gewisse Affinität zum Rezeptor aufweisen, werden angewandt, um die verschiedenen Rezeptorkonformationen neu zu verteilen. Inverse Agonisten stabilisieren den inaktiven Zustand (R), agonistische Liganden stabilisieren bevorzugt den aktiven Zustand (R^*) (Milligan et al., 1995), neutrale Antagonisten weisen keine Präferenz für eine bestimmte Rezeptorkonformation auf. Interessanterweise wurden viele der bisher zu den neutralen GPCR-Antagonisten gezählten Substanzen in letzter Zeit als inverse Antagonisten entlarvt (McCune et al., 2000; Stevens et al., 2000; Miserey-Lenkei et al., 2002). Neben konstitutiv aktiven Rezeptoren (CARs) wurden viele konstitutiv aktive Mutanten hergestellt (CAMs), die den aktiven Zustand imitieren und somit in Abwesenheit eines Liganden Signale weiterleiten (z.B. Pei et al., 1994; Jensen et al., 2000; Stevens et al., 2000; Scheer et al., 2000; Ramsay et al., 2001; Greasley et al., 2001; Miserey-Lenkei et al., 2002). Einige natürlich auftretende Mutationen werden auch mit Krankheiten wie die auf Männer limitierte verfrühte Pubertät (durch den Luteinisierenden-Hormon-Rezeptor, Shenker et al., 1993), Schilddrüsenadenom (mittels des Thyrotropin-Rezeptors, Parma et al., 1993), Retinitis pigmentosa (durch den Rhodopsin-Rezeptor, Rao et al., 1994) und autosomale dominante Hypocalcämie (mittels des Ca^{2+} -sensitiven-Rezeptors, Brown, 1999) in Zusammenhang gebracht; einen Überblick gibt Coughlin (1994). CAMs wurden in den letzten Jahren auch intensiv genutzt, um Einblicke in die Konformationsänderungen in Rezeptoren zu untersuchen, die im Anschluss an das Binden

des Liganden am GPCR auftreten (Lefkowitz et al., 1993; Scheer & Coteccia, 1997; Leurs et al., 1998; Pauwels & Wurch, 1998). Im Gegensatz dazu ist wenig bekannt bezüglich der Frage, ob CAMs in der Lage sind, differentiell verschiedene Signaltransduktionskaskaden zu regulieren. Eines der wenigen Beispiele, bei denen diese Fragestellung adressiert wurde, ist der α_{1b} -Adrenozeptor. Eine Cys128Phe-Mutante ist konstitutiv aktiv im Hinblick auf die Aktivierung der PLC- β , allerdings nicht, wenn die Aktivität der Phospholipase A_2 den gemessenen Endpunkt darstellt. Im Gegensatz dazu zeigt die Ala293Glu-Mutante des gleichen Rezeptors konstitutive Aktivität bei beiden Signaltransduktionswegen (Perez et al., 1996). Genauso wenig ist bekannt, ob CARs, die in der Lage sind, mehrere Signaltransduktionswege anzuschalten, diese unterschiedlich beeinflussen.

1.1.4 GPCRs in der Therapie

GPCRs stellen mehr als 50% der Zielproteine für die sich auf dem Markt befindenden Therapeutika dar, und mehr als ein Viertel der 100 meistverkauften Medikamente wirkt über die Beeinflussung von GPCRs (Flower, 1999). Um einen Eindruck der Bedeutung von GPCRs in der heutigen Therapie zu vermitteln, gibt Tabelle 2 einen Überblick über einige ausgewählte GPCRs und einige der eingesetzten Medikamente.

Tabelle 2: **Ausgewählte GPCRs und Therapeutika in der Arzneimitteltherapie.**

GPCR von	Therapeutika	GPCR von	Therapeutika
Acetylcholin	Ipratropiumbromid, Dicyclomin	Leukotrien	Pranlukast, Zafirlukast
Adrenalin	Atenolol (β_1), Clonidin (α_2), Salbutamol (β_2), Doxazosin (α_1)	Opioid	Buprenorphin, Morphin, Alfentanil, Butorphanol
Angiotensin	Losartan, Eprosartan, Valsartan	Prostaglandin	Misoprostol
Dopamin	Haloperidol, Metoclopramid, Risperidon, Olanzapin	Serotonin	Sumatriptan, Risperidon, Buspiron, Olanzapin, Cisaprid
Histamin	Dimenhydrinat, Loratadin, Ranitidin, Cimetidin, Cetirizin	Somatostatin	Octreotid

Zudem konnten mehrere erbliche Krankheiten auf Mutationen in GPCRs zurückgeführt werden, die zu Fehlfunktionen in den entsprechenden Gebieten führen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: **Natürliche Mutationen in GPCRs und die jeweiligen Krankheiten.** Nach Wilson et al. (1999).

Krankheit	GPCR von
Retinitis pigmentosa	Rhodopsin
Verfrühte Pubertät	Luteinisierendem Hormon
Hyperfunktion der Schilddrüse	Thyreotropin
X- verbundener nephrogener Diabetes	Vasopressin V ₂
Hypocalcämie, Hypocalcurie, Hyperparathyroidismus	Calcium
Diabetes	Glucagon
Glucocorticoidmangel	Adrenocorticotropin
Fettsucht	Adrenalin (β_3)
Zwergwuchs	Parathyrin

Im Gebiet der Herz-Kreislaferkrankungen spielen einige GPCRs eine wichtige Rolle in der Therapie, wobei hier nur die wichtigsten erwähnt seien:

- (i) die adrenergen Rezeptoren (von denen bis dato 9 Subtypen kloniert worden sind),
- (ii) die Angiotensin- und Endothelin-Rezeptoren sowie
- (iii) der muskarinische M₂-Rezeptor.

Als neue potentielle „Kandidaten“ für die Entwicklung neuer Therapien in der Herz-Kreislaufforschung werden zur Zeit der Urotensinrezeptor, der Apelinrezeptor, der Vassopressin-V₂-Rezeptor, die Urocortinrezeptoren, die Relaxinrezeptoren sowie Rezeptoren der edg-Familie diskutiert. Auf die Rezeptoren der edg-Familie sowie deren Liganden wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2 Die Lipide LPA und S1P

Mitte bis Ende des 19. Jahrhunderts wurden die Lysophospholipide (LPLs) Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA; 1-Acy-2-hydroxy(lyso)-sn-glycero-3-phosphat) zusammen mit weiteren mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren Substanzen aus Zellen und Geweben extrahiert.

Der erste beschriebene, von LPA induzierte physiologische Effekt, die Kontraktion des atropinisierten Magens, stammt aus dem Jahr 1949. In dieser Veröffentlichung von Vogt (Vogt,

1949) wird die Substanz noch als „Darmstoff“ bezeichnet; als Wirkkomponente konnte Vogt später Acetalphosphatidsäure identifizieren. Auch wenn es sich hier nicht direkt um LPA handelte, stellt diese Arbeit jedoch die erste dar, die die physiologische Wirkung eines Lysophospholipides beschreibt. Erst 1978 wurden die vasopressiven Effekte eines Sojabohnenextraktes - als Wirkstoff stellte sich LPA heraus - (Tokumura et al., 1978) veröffentlicht. Es folgten die Untersuchungen an Plättchen, die Entdeckung der wachstumsfaktor-ähnlichen Wirkungen von LPA, und 1996 wurde der erste von insgesamt drei Rezeptoren für LPA kloniert (Hecht et al., 1996).

S1P wurde zunächst als ein Zwischenprodukt beim Abbau von langkettigen Sphingoidbasen beschrieben (Stoffel, 1970). Als 1990 gezeigt werden konnte, dass S1P ein potentes mitogenes Agens in diversen Zellarten darstellt (Zhang et al., 1990), kam die Vermutung auf, dass S1P eine andere wichtige physiologische Rolle spielen könnte. Im darauffolgenden Jahrzehnt wurde die Beteiligung von S1P bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen gezeigt. 1998 konnte dann der schon 1990 publizierte Rezeptor *edg1* (heute $S1P_1$) als der erste von fünf hochaffinen S1P-Rezeptoren identifiziert werden (Lee et al., 1998).

Wirft man einen Blick auf die Publikationen, die in den letzten Jahren auf dem Forschungsgebiet der Phospholipide entstanden sind, wird deutlich, welche Bedeutung diese Substanzklasse hat. Während im Jahr 1993 noch etwa 5 Veröffentlichungen zu registrieren waren, ist diese Zahl im Jahre 1999 bis auf 150 mit noch immer steigender Tendenz angestiegen. Da noch viele Fragen offen sind, wird sicher auch in Zukunft das Interesse an diesen Substanzen weiterhin bestehen bleiben.

1.2.1 Struktur, Vorkommen sowie Bildung und Abbau

Sowohl S1P als auch LPA weisen als Vertreter der Lysophospholipide (LPL) eine amphipatische Struktur auf. Während LPA ein Glycerinrückgrat (Glycerolipid) hat und damit zu der größeren Gruppe der LPLs gehört, tritt bei S1P eine Sphingosinstruktur an die Stelle des Glycerins (Sphingolipid) (Abbildung 4). Beiden ist jedoch die lange hydrophobe Kette mit einer Doppelbindung gemeinsam, wobei letztere beim S1P keine Rolle zu spielen scheint, da das dihydroS1P (dhS1P), dem eben diese Doppelbindung fehlt, identische Wirkungen aufweist wie das S1P selbst.

Die Konzentration von LPA im Serum liegt zwischen 1-10 μM , während die normalen Konzentrationen im Plasma deutlich geringer sind. Dies unterstützt die These, dass Plättchen, die ihre Produkte in das Serum abgeben, die Hauptquelle von LPA darstellen (Eichholtz et al., 1993). Makrophagen, einige weitere Leukozytenarten, Epithelzellen, Ovarialkarzinome und einige andere Tumoren sind zusätzlich in der Lage, LPA zu produzieren. Dadurch kann es zu sehr hohen intrazellulären- und Plasmakonzentrationen (bis zu 50 μM bei einigen inflammatorischen und neoplastischen Krankheiten) kommen. Durch hohe Albumin- ($K_D = 350 \text{ nM}$) und

Gelsolinbindung ($K_D = 6-7 \text{ nM}$) wird die Zulieferung zu den Zellen und die effektive Potenz des LPA verstärkt (Goetzl et al., 2000). Interessanterweise ist LPA auch ein Bestandteil des oxidierten *Low-density-Lipoprotein*, dem „schlechten“ Teil der cholesterinenthaltenden Lipoproteine (Siess et al., 1999).

S1P kommt im Serum in einer Konzentration von 400–500 nM vor, im Plasma ist die Konzentration etwa halb so groß. S1P wird in Plättchen gespeichert und aus diesen freigesetzt, sobald diese aktiviert werden. Es kann jedoch auch in vielen verschiedenen Zelltypen synthetisiert werden, wenn diese von extrazellulären Stimulantien wie Wachstumsfaktoren oder Zytokinen aktiviert werden.

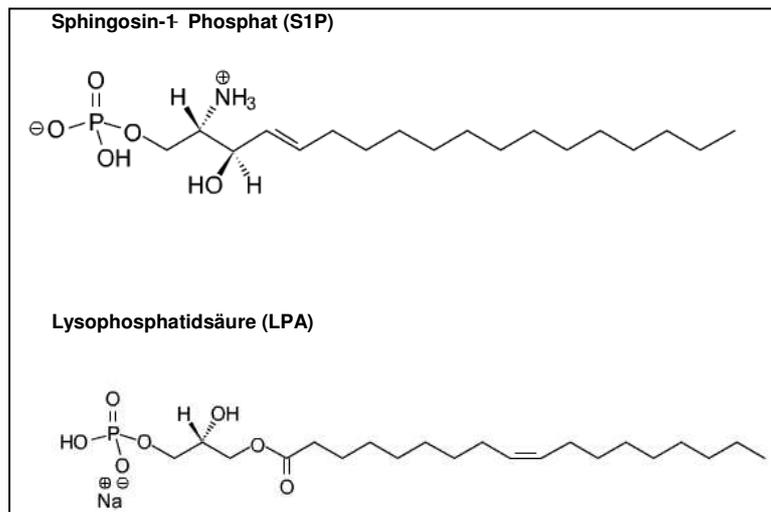


Abbildung 4: **Strukturformel von S1P und LPA**

LPA und S1P können beide in Zellen biosynthetisiert werden, entweder *de novo* oder als Reaktion auf einen Stimulus durch Freisetzung aus den jeweiligen Glycerolipiden und Phospholipiden und der darauffolgenden enzymatischen Konversion. Der zweite Weg wird als die Hauptquelle von freiem und freigesetztem LPA und S1P angesehen.

Die intrazelluläre metabolische *de-novo*-Synthese von LPA besteht aus der Reaktion eines aus Glucose gewonnenem Dihydroxyacetonphosphat mit einem Fettsäure-CoA (Coenzym A) über einige NADH- oder NADPH-abhängige Schritte. Allerdings wird der Großteil des freigesetzten LPA in Mikrovessikeln von Membranen stimulierter Zellen (Plättchen, Leukozyten oder anderen; Meyer zu Heringdorf et al., 1997) produziert. Die Kombination mehrerer Enzyme (Sphingomyelinasen, Phospholipasen und Diacylglycerolkinase (DAGK)) führt zu hohen Konzentrationen von Phosphatidsäure (PA) in den Mikrovessikeln (siehe Abbildung 5). Phospholipase A_2 (PLA_2) konvertiert PA zu LPA, welches dann in die extrazellulären Flüssigkeiten abgegeben werden kann. Zellmembranen enthalten nur geringe Mengen an freiem LPA, wahrscheinlich da dieses schnell wieder in PA umgewandelt wird. Extrazelluläres und zyttoplasmatisches LPA wird von membranständigen Enzymen abgebaut (Fourcade et al., 1995).

Einleitung

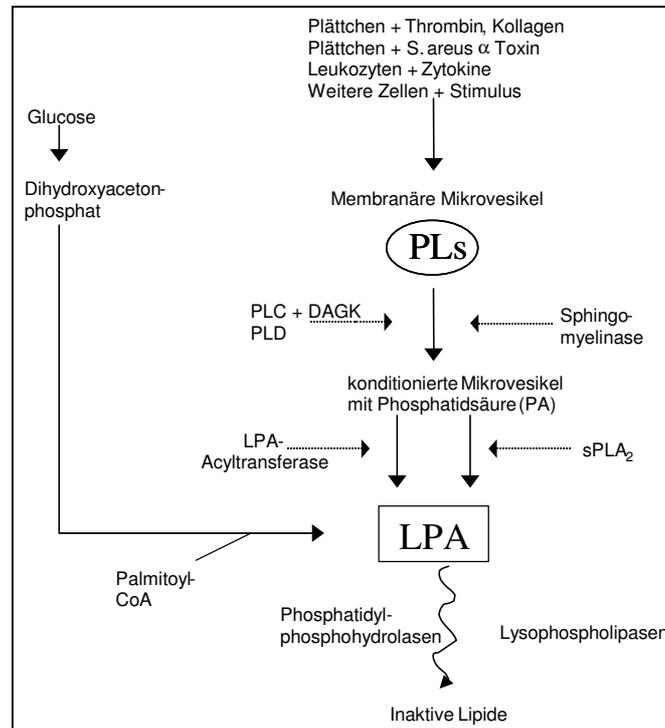


Abbildung 5: **Biosynthesewege von LPA.** PL: Phospholipide; sPLA₂: Kleine PhospholipaseA₂; PLC: Phospholipase C; PLD: Phospholipase D; DAGK: Diacylglycerolkinase. Modifiziert nach Goetzel et al. (1997).

Die Schritte, die zur Bildung von S1P führen, ähneln im großen und ganzen denen des LPA, jedoch ist mehr über die zelluläre Kompartimentierung der einzelnen Teilschritte des Prozesses bekannt (Spiegel & Milstien, 1995; Spiegel & Merrill, 1996). Der initiale intrazelluläre Schritt der *de-novo*-Biosynthese von Sphingoiden basiert auf der Kondensation von Fettsäure-CoA und Serin unter Bildung eines 3-Ketosphinganins. Dieses wird reduziert und in Dihydroceramid umgewandelt. Alle diese Schritte finden im endoplasmatischen Retikulum statt. Der Bildung von Sphingosin (Sph) und S1P aus gespeichertem Sphingomyelin (die Grundbausteine der Membranen) kommt eine weitaus größere Bedeutung zu (siehe Abbildung 6). Der Abbau von Sphingomyelin durch verschiedene Sphingomyelinasen erfolgt in erster Linie in Lysosom- und Endosommembranen und in der Plasmamembran. Hier findet auch primär die Umwandlung von dem durch die Sphingomyelinasen gewonnenem Ceramid zu Sph mittels Ceramidasen statt. Demgegenüber ist die Aktivität des Enzyms Sphingosinkinase, welches für die darauffolgende Bildung von S1P aus Sph zuständig ist, im endoplasmatischen Retikulum am größten. Für den Abbau des S1P ist in erster Linie eine spezifische Lyase verantwortlich, die wiederum im endoplasmatischen Retikulum S1P spaltet. Ein weiterer Weg, die Konzentration von S1P zu verringern, führt über die enzymatische Umsetzung von S1P zu Sph mittels Phosphatasen, die allerdings nicht S1P-spezifisch agieren.

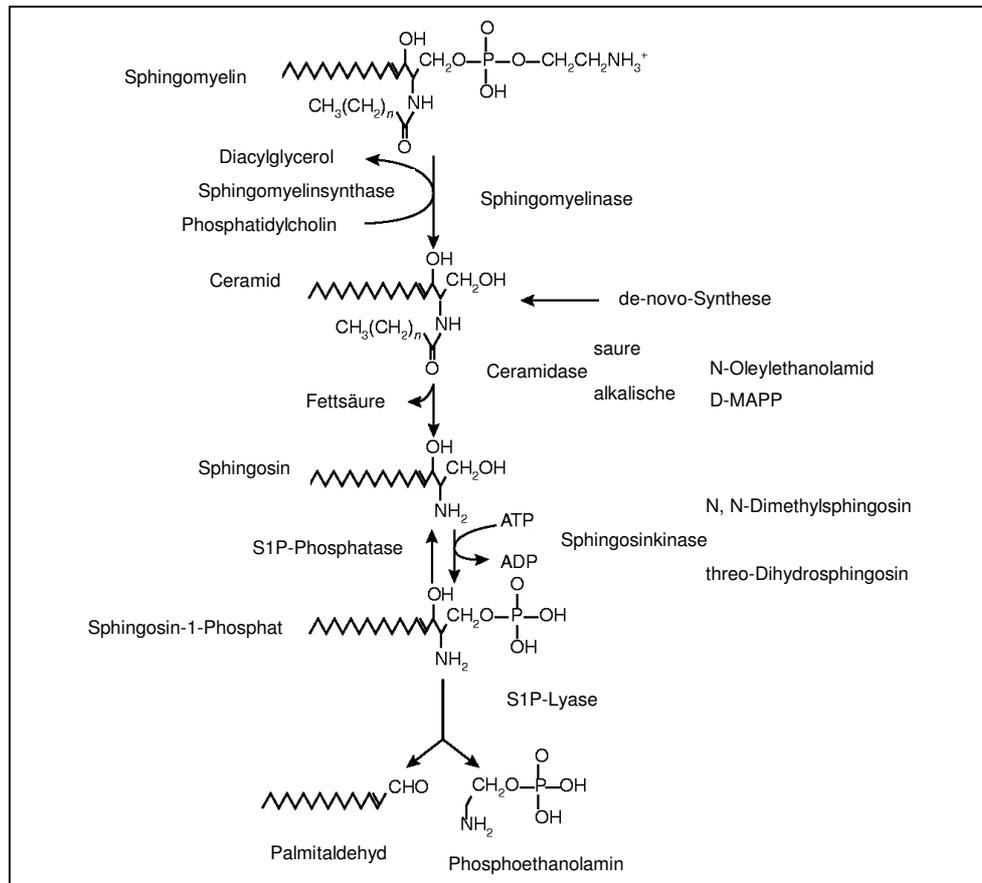


Abbildung 6: **Biosynthese von S1P; D-MAPP: D-Erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenylpropanol.**
 Modifiziert nach Pyne & Pyne (2000b).

Das Zusammenspiel zwischen Sphingosinkinase und S1P-Lyase bestimmt somit die Konzentration von S1P und sorgt dafür, dass ein Gleichgewicht zwischen Ceramid und S1P aufrechterhalten wird. Diese dynamische Balance zwischen Ceramid und Sph sowie S1P könnte ein entscheidender Faktor bei der Bestimmung des Zellschicksals sein: Während Ceramid und Sph das Zellwachstum stoppen, unterstützt S1P sowohl die Zellproliferation als auch das Zellüberleben.

1.2.2 Zelluläre und physiologische Effekte

LPA und S1P haben in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da sie Einfluss auf viele wichtige biologische Funktionen nehmen (Moolenaar et al., 1997; Pyne & Pyne, 2000b; Morris, 1999; Lynch & Im, 1999) und regelmäßig neue Wirkungen der Lysophospholipide beschrieben werden.

Zu den biologischen Antworten, die LPA hervorrufen kann, gehören die Plättchen-Aggregation (Jalink et al., 1994; Siess et al., 1999; Gueguen et al., 1999), die Kontraktion glatter Muskelzellen (Tokumura et al., 1980), vasoaktive Effekte *in vivo* (Tokumura et al., 1995), Chemotaxis (Jalink et al., 1993), die Expression von Adhäsionsmolekülen (Lee et al., 1998a; Rizza et al., 1999), die erhöhte Permeabilität der Verbindungsstellen von Endothelzellen an der

apikalen Seite (Schulze et al., 1997) und die Induktion von Stressfasern (Gohla et al., 1998), um nur einige zu nennen. Einen Überblick gibt Moolenaar et al. (1997). Die biochemischen Signaltransduktionswege, die die beschriebenen Effekte von LPA vermitteln, sind u.a. die Stimulation von Phospholipasen, die Mobilisation von intrazellulärem Calcium, die Hemmung der Adenylatzyklase, die Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinasen sowie der Ras-Raf-MAP-Kaskade und die Stimulation der Rho-GTPasen (Moolenaar et al., 1997). LPA wird mit der Induktion von endothelialer Dysfunktion und Atherogenese sowie mit Mikroentzündungen in Verbindung gebracht. Die vasoaktiven Effekte von LPA sind schon sehr früh (Ende der siebziger Jahre) beschrieben worden, während die Wirkungen auf die embryonale Entwicklung sowie eine eventuelle Verbindung zu Brustkrebs und Ovarialkarzinomen erst vor einigen Jahren bekannt geworden sind. Die wachstumsfaktorähnlichen Effekte von LPA bei der Wundheilung sind bis heute nur *in vitro* beschrieben worden, aber auch hier liegt eine physiologische Relevanz der *in-vitro*-Effekte nahe. Einen Überblick über die Wirkungen von LPA gibt Tigyi et al. (2001).

S1P wird insbesondere mit der Beeinflussung der Zellbeweglichkeit (Hla et al., 1999; Hobson et al., 2001), der Induktion von oder dem Schutz vor Apoptose (programmiertem Zelltod) (Hisano et al., 1999; Kwon et al., 2001), der Angiogenese *in vitro* und *in vivo* (Lee et al., 1999a), Tumor-Invasion (Sadahira et al., 1992; Stam et al., 1998), der Plättchen-Aktivierung (Yatomi et al., 1995) und der Retraktion von Neuronen (Postma et al., 1996) in Verbindung gebracht. Auf zellulärer Ebene bewirkt S1P u.a. die Aktivierung der PLC- β und die darauffolgende Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} (Kon et al., 1999; Ancellin and Hla, 1999), die Aktivierung des MAP-Kinasen-Signaltransduktionsweges (An et al., 2000), die Stimulation des einwärts rektifizierenden K^+ -Kanals (Van Koppen et al., 1996; Himmel et al., 2000) sowie die Hemmung oder Stimulation der Adenylatzyklase (Kon et al., 1999). Einen Überblick über die bei der Vermittlung der S1P-Effekte involvierten Signaltransduktionswege ist bei Pyne & Pyne (2000b) zu finden. Auch die Krankheiten, mit denen S1P in Verbindung gebracht wird, sind vielfältig, und es kommen immer wieder neue Beobachtungen hinzu: Eine Schlüsselfunktion von S1P ist die Angiogenese (die Bildung neuer Blutgefäße), zu der mehrere Untersuchungen durchgeführt wurden (Wang et al., 1999a; Lee et al., 1999a; Lee et al., 1999b). Diese spielt u.a. in der Herz-Kreislaufforschung eine wichtige Rolle. Auf dem Gebiet der Entzündungen scheint S1P ebenfalls von Relevanz zu sein (Panetti et al., 2001), da es u.a. die Migration der Leukozyten beeinflusst. Die in Abhängigkeit vom Zelltyp auftretenden proliferativen oder antiproliferativen Effekte von S1P könnten zudem bei der Frage der Krebsentwicklung eine Rolle spielen (Goetzl et al., 1999; Wang et al., 1999b).

Die meisten der beschriebenen Effekte von LPA und S1P sind allerdings derzeit noch nicht soweit untersucht, dass schon von einer klinischen Relevanz gesprochen werden kann. Erhöhte Spiegel von LPA, S1P und verwandten Substanzen konnten jedoch bei drei pathologischen Zuständen beobachtet werden: Akuten Lungenkrankheiten, Verletzung von Oberflä-

chenendothelzellen durch Erfrierungen oder Verbrennungen sowie bei verschiedenen Melanomen und Ovarialkarzinomen. Existierende Tiermodelle werden hier weitere Aufklärung liefern. Als relativ gesichert gilt jedoch, dass LPA - Plasmakonzentrationen von LPA steigen dramatisch bei Ovarialkarzinomen - als Marker bei Ovarialkarzinomen und anderen gynäkologischen Krebsarten zu betrachten ist (Fang et al., 2002, Mills et al., 2002). Ob die erhöhten S1P-Spiegel bei koronarer Herzkrankheit von Relevanz sind, muss noch durch klinische Daten belegt werden (siehe auch Goetzl et al., 2002).

1.2.3 Die LPA- und S1P-Rezeptoren

Die Effekte von S1P und LPA werden über GPCRs vermittelt; es ist jedoch anerkannt, dass S1P auch intrazelluläre Effekte induziert (Spiegel & Milstien, 2000), jedoch sind hier die Zielproteine unbekannt. Es soll daher an dieser Stelle nur auf die Rezeptoren und damit auf die extrazellulär induzierten Effekte der Lipide eingegangen werden.

Die Familie der LPA/S1P-Rezeptoren umfasste zu Beginn dieser Arbeit sieben Mitglieder, von denen der erste – der LPA-Rezeptor *vzg-1* (*edg2*, LPA_1) - im Jahre 1996 kloniert wurde. Der erste S1P-Rezeptor – *edg1* (*endothelial differentiation gene*, $S1P_1$) - folgte im Jahr 1998. Da in der Nomenklatur dieser Rezeptoren verschiedene Ansätze verfolgt wurden, sind in Tabelle 4 alle in der Literatur verwendeten Benennungen aufgeführt. Die offizielle, von der IUPHAR eingeführte Nomenklatur (Chun et al., 2002), die den Liganden und die Reihenfolge der Entdeckung der Rezeptoren für die Benennung heranzieht, wird in dieser Arbeit bevorzugt.

Tabelle 4: **Die Nomenklatur der LPA/S1P-Rezeptoren**

IUPHAR Nomenklatur	edg-Name	Weitere Synonyme
$S1P_1$	<i>edg1</i>	Lp_{B1}
LPA_1	<i>edg2</i>	Lp_{A1} <i>Vzg-1</i> (Ratte), <i>rec.1.3</i>
$S1P_3$	<i>edg3</i>	Lp_{B3}
LPA_2	<i>edg4</i>	Lp_{A2}
$S1P_2$	<i>edg5</i>	Lp_{B2} , H218 (Ratte), AGR16 (Ratte)
$S1P_4$	<i>edg6</i>	Lp_{B4}
LPA_3	<i>edg7</i>	Lp_{A3}
$S1P_5$	<i>edg8</i>	Lp_{B5} , <i>Nrg-1</i> (Ratte)

Obwohl die Lipide S1P und LPA schon lange bekannt waren, wurde erst 1989 von van Corven et al. beschrieben, dass die Effekte von LPA mit großer Wahrscheinlichkeit über einen GPCR vermittelt werden. 1996 gelang dann das Klonieren und das *deorphaning* des ersten LPA-Rezeptors im Zuge von Entwicklungsstudien an der Hirnrinde der Maus. Die Experimente waren darauf ausgerichtet, GPCRs zu identifizieren, die mit der Neuronenproduktion in

Verbindung stehen (Hecht et al., 1996). Der erste S1P-Rezeptor wurde 1990 von Hla und Maciag kloniert und 1998 von Lee et al. (1998b) als S1P-Rezeptor charakterisiert. Da er zunächst als *orphan*-GPCR identifiziert worden war, der potentiell eine Rolle in der Differenzierung von Endothelzellen spielt, wurde ihm zunächst der Name *edg1* (endothelial differentiation gene) gegeben. Diese Benennung wurde danach für alle weiteren identifizierten LPA/S1P-Rezeptoren weiter verwendet, auch ohne dass diese Wirkungen auf Endothelzellen haben, bis die neue Nomenklatur von der IUPHAR eingeführt wurde. Die Rezeptoren weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie (40-50%) auf.

S1P₁ (edg1): Der S1P₁-Rezeptor wird von S1P im niedrig nanomolaren Bereich ($K_D = 8 \text{ nM}$, Zondag et al., 1998) sowie von LPA mit niedriger Affinität ($K_D = 2,3 \text{ }\mu\text{M}$, Lee et al., 1998a) aktiviert und vermittelt seine Effekte ausschließlich über $G\alpha_i$ (Windh et al., 1999). Er bewirkt hierbei PLC- und MAP-Kinasen-Aktivierung, mobilisiert intrazelluläres Calcium und hemmt die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion. Der S1P₁-Rezeptor ist an der Regulierung der Zellbewegungen, -proliferation und -morphologie sowie am Überleben der Zellen beteiligt. Aufgrund seiner Wirkungen auf die Endothelzellen wird ein Zusammenhang zwischen dem S1P₁-Rezeptor und der Angiogenese sowie der Reifung des vaskulären Systems in Säugern postuliert (Lee MJ et al., 1999b). S1P₁-defiziente Mäuse sterben zwischen dem 12. und 14. Tag, da das Gefäßsystem kollabiert und es zu Blutungen im Embryo kommt. Der Rezeptor ist aufgrund seiner Expression in Endothelzellen in den meisten peripheren Geweben weit verbreitet (Hla et al., 1990), wurde jedoch auch in zerebralen Zellen gefunden (Liu et al., 1997).

S1P₂ (edg5): Der S1P₂-Rezeptor wird von S1P mit einem K_D von 20-27 nM (Zhang et al., 1999) aktiviert. Im Gegensatz zum S1P₁-Rezeptor koppelt der S1P₂-Rezeptor an mehrere G-Proteine ($G\alpha_q$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12/13}$, Kon et al., 1999), hemmt Wachstumsfaktor-induzierte Chemotaxis und ist in Zellen exprimiert (vaskulären glatten Muskelzellen und Melanomzellen), in denen S1P antiproliferativ wirkt. Die Rezeptoren S1P₁ und S1P₂ sind ein Beispiel für zwei Rezeptoren der gleichen Familie, deren Effekte entgegengesetzt sind. Einen wichtigen Hinweis für die Funktion des S1P₂-Rezeptors gibt die Entdeckung einer Mutante des Zebrafisches S1P₂-Rezeptors *mil, miles apart*. Hier weisen Untersuchungen darauf hin, dass der Rezeptor in der Entwicklung des Herzens eine Rolle spielt. Der S1P₂-Rezeptor ist in Lunge, Herz und Hirn exprimiert (Zhang et al., 1999) und schon während der embryonalen Entwicklung im Hirn nachweisbar (Mc Lennan et al., 1994).

S1P₃ (edg3): Wie der S1P₂-Rezeptor wird auch der S1P₃-Rezeptor mit einem K_D von 23-26 nM von S1P (Kon et al., 1999) aktiviert. Die Ähnlichkeit erstreckt sich auch auf die aktivierten G-Proteine $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12/13}$, wobei hier noch die GTPase Rho hinzukommt. Effekte auf den Phänotyp bei rekombinanter Expression in Mäusen konnten nicht beobachtet werden, so dass man eine redundante Funktion der S1P-Rezeptoren vermuten kann. Das Expressionsprofil des S1P₃-Rezeptors umfasst Herz, Niere, Lunge (Yamaguchi et al., 1996) sowie bei der Ratte die Schwann-Zellen.

S1P₄ (edg6): Der S1P₄-Rezeptor weist im Hinblick auf die Homologie zu den anderen S1P-Rezeptoren eine deutlich geringere Ähnlichkeit auf, ist aber mit einem K_D von 13-63 nM (Yamazaki et al., 2000) von S1P ein hochaffiner S1P-Rezeptor. Er induziert Ca²⁺-Mobilisierung und aktiviert MAP-Kinasen und PLC. Seine Expression beschränkt sich auf lymphoide und hämatopoetische Gewebe sowie auf die Lunge.

LPA₁ (edg2): Der LPA₁-Rezeptor wird in nanomolaren Konzentrationen von LPA aktiviert (Bestimmung einer Affinitätskonstante ist noch nicht erfolgt) und koppelt an Gα_i, Gα_q oder Gα₁₂. Die LPA-induzierte Proliferation von Adipozyten, der Schutz von T-Zellen vor Apoptose und die Ansammlung der Fibronectinmatrix in Fibroblasten werden vermutlich z.T. über den LPA₁-Rezeptor vermittelt. LPA₁-defiziente Mäuse zeigen einen komplexen Phänotyp mit 50% Letalität (eine genauere Beschreibung siehe Contos et al., 2000a). Die Expression des Rezeptors ist sowohl im zentralen Nervensystem als auch in vielen peripheren Geweben nachweisbar (Hecht et al., 1996).

LPA₂ (edg4): Der LPA₂-Rezeptor ist ein hochaffiner LPA-Rezeptor, der über Gα_q und Gα_i seine Signale vermittelt (Ishii et al., 2000). Interessanterweise existieren mehrere Variationen in verschiedenen Krebszellarten. Da die Mutationen meist im C-Terminus auftreten, welcher für das Koppeln an das G-Protein essentiell ist, könnte dies eine Ursache für abnorme Zelltransformationen darstellen (Contos & Chun, 2000b). Zudem wird der Rezeptor mit den LPA-vermittelten Wirkungen auf das Immunsystem in Verbindung gebracht und ist bei Ovarialkarzinomen hochreguliert. Seine Expression beschränkt sich auf das neonatale Hirn der Maus, Testis, Niere, Lunge und das lymphoide Gewebe (Contos et al., 2000c).

LPA₃ (edg7): Der LPA₃-Rezeptor aktiviert nach LPA-Stimulation in erster Linie Gα_q (Im et al., 2000a; Ishii et al., 2000). In humanen Geweben ist der Rezeptor in Testis, Prostata, Herz und den frontalen Regionen der zerebralen Rinde zu finden (Im et al., 2000a).

Ein weiterer potentieller LPA-Rezeptor aus *Xenopus*-Oozyten (xPSP24) konnte 1996 von Guo et al. kloniert werden, der jedoch auf Aminosäureebene nicht in das Muster der oben dargestellten Familie der S1P/LPA-Rezeptoren passt. Marchese et al. (1999) konnten einen homologen humanen Rezeptor hGPR45 klonieren, dessen Ligand jedoch noch unbekannt ist.

Die Untersuchungen an LPA/S1P-Rezeptoren haben das Interesse an weiteren Rezeptoren für LPLs geweckt. So konnten zusätzlich Rezeptoren identifiziert werden, die auf Psychosin (Galactosphingosin; TDAG8-Rezeptor; Im et al., 2001), Sphingosylphosphorylcholin (OGR-1; Xu et al., 2000) sowie Lysophosphatidylcholin (G2A; Kabarowski et al., 2001) hochaffin reagieren. Über diese Rezeptoren ist noch sehr wenig bekannt, so dass hier nicht weiter darauf eingegangen wird.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Die Zuordnung der S1P- und LPA-Effekte zu den jeweiligen LPA/S1P-Rezeptoren wird durch die Tatsache erschwert, dass die Rezeptoren überlappend in mehreren Geweben gemeinsam vorhanden sind (Rizza et al., 1999; Lee et al., 1999b), dass sie mehrere Signaltransduktionswege auch z.T. überlappend aktivieren (Ancellin und Hla, 1999; Kon et al., 1999; An et al., 2000) und dass keine subtypspezifischen Liganden existieren (Lee et al., 1999b). Es ist daher erforderlich, alle Rezeptoren zu identifizieren, die in die Effekte der Lipide involviert sein können.

Ziel dieser Arbeit war es, nach der bioinformatischen Identifizierung neuer potentieller S1P/LPA/LPL-Rezeptoren diese zunächst bezüglich ihrer Expression zu charakterisieren.

Danach sollten biologisch aktive Substanzen identifiziert werden, die die neuen Rezeptoren agonistisch, antagonistisch oder allosterisch modulieren. Dies sollte mit Hilfe eines „Universalassayverfahrens“ unter Nutzung von modifizierten G-Proteinen mit der Fähigkeit, GPCRs aus unterschiedlichen funktionellen Klassen an einen zellulären Effektorweg zu koppeln, erfolgen. In diesem Verfahren identifizierte Substanzen sollten danach zur Charakterisierung der Signaltransduktionswege herangezogen werden. Zudem sollten Besonderheiten bei der Rezeptorexpression in Säugerzellen wie konstitutive Aktivität, morphologische Veränderungen oder Speziesunterschiede von Rezeptororthologen herausgearbeitet werden.

Alle Daten sollten zur weiteren Eingrenzung der S1P/LPA-Effekte zu den jeweiligen Rezeptoren sowie zum besseren Gesamtverständnis der S1P/LPA-Wirkungen beitragen.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die angewandten molekularbiologischen, zellbiologischen und biochemischen Methoden erläutert sowie die hierbei eingesetzten Materialien tabellarisch aufgelistet.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Gewinnung von Plasmid-DNA

Nach der Transformation der Plasmid-DNA in Bakterien mittels Hitzeschock wurden zwei Methoden zur Isolierung und Reinigung der DNA angewandt: Die Mini- und die Maxipräparation. Erstere diente zur Herstellung geringer DNA-Mengen, welche durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit geprüft wurden. Mittels Maxipräparation wurde die Plasmid-DNA in der erforderlichen Menge hergestellt, die Qualität sowie die DNA-Menge wurden photometrisch sowie durch Auftragen auf ein Agarosegel nach Linearisierung bestimmt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Transfektion, als PCR-Mutterstrang zur Herstellung weiterer Konstrukte, zur Gewinnung von cRNA sowie als Positivkontrolle bei der qualitativen PCR verwendet.

2.1.1.1 Transformation mittels Hitzeschock

Zur Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien wurden folgende genetisch veränderte E.coli-Stämme verwendet: DH5 α (Gibco BRL) oder MC1061 (Invitrogen) (Angaben zum Genotyp siehe Tabelle in Sambrook et al., Appendix A9). Standardmäßig erfolgte die Transformation in DH5 α -Bakterien. Zur Transformation von Plasmiden, bei denen die Ampicillinresistenz hinter einem STOP-Codon liegt und somit nicht abgelesen werden kann (z.B. pcDNA-1.1-Konstrukte), wurden MC1061-Bakterien verwendet, welche mit einem P3-Episom ausgestattet sind. Dieses ermöglicht durch Suppression des STOP-Codons ein Ablesen der Ampicillinresistenz.

DH5 α -Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 100 μ l dieser Bakteriensuspension in ein 15-ml-Röhrchen mit luftdurchlässigem Deckel überführt und danach mit ca. 5-10 ng Plasmid-DNA oder 1-2 μ l des Ligationsansatzes (siehe Abschnitt 2.1.8) angeimpft und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in einem auf 42°C geheiztem Wasserbad für 45 s einem Hitzeschock unterzogen. Nach einer 2-minütigen Erholungsphase auf Eis wurden 800 μ l 2YT-Medium (Tabelle 5) hinzugefügt und die Transformationsmischung bei 37°C für 60 min im Inkubator bei 250 rpm geschüttelt. Handelte es sich bei der transformierten DNA um einen Ligationsansatz (siehe Abschnitt 2.1.8), wurden 200 μ l und 600 μ l auf 2YT-Agarplatten (100 mg/l Ampicillin, Sigma, Tabelle 5) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Wurde die Transformation zur Plasmidgewinnung mittels Maxipräparation (siehe Abschnitt

2.1.1.3) durchgeführt, wurde der komplette Ansatz in 100 ml 2YT-Medium (100 mg/l Ampicillin, Sigma) in einem 250-ml-Schikaneerlenmeyerkolben über Nacht bei 37°C im Inkubator geschüttelt.

Bei der Transformation von MC1061-Bakterien wurden zusätzlich 2 µl β-Mercaptoethanol (0.5 M) zum Transformationsgemisch hinzugefügt.

2.1.1.2 Minipräparation

Die Gewinnung geringer DNA-Mengen aus Bakterienkulturen erfolgte mit Hilfe des QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen) unter Verwendung der im Kit enthaltenen Puffer. Das Prinzip dieser Präparation beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien mit anschließender Adsorption der DNA auf der Silikatmembran der QIAprep-Säule unter hoher Salzkonzentration (Vogelstein und Gillespie, 1979). Nach mehrfachen Waschschritten kann das Plasmid dann direkt von der Säule eluiert werden.

In einem 15-ml-Röhrchen wurden 3 ml 2YT-Medium (100 mg/l Ampicillin, Sigma) mit einer Einzelkolonie der transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht (14-16 h) bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (EBA 12, Hettich-Zentrifugen) abzentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Die restlichen 1,5 ml wurden zur eventuellen Weiterverwendung für die Maxipräparation im Kühlschrank für maximal fünf Tage gelagert. Die Isolierung der DNA aus dem Bakteriensediment erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 30-50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) aufgenommen.

2.1.1.3 Maxipräparation

Die Gewinnung größerer DNA-Mengen aus Bakterienkulturen erfolgte mit Hilfe des QIAfilter-Plasmid-Maxi-Kits (Qiagen) unter Verwendung der im Kit enthaltenen Puffer. Unter geeigneten niedrig-Salz- und pH-Bedingungen, die für die positive Ladung der Diethylaminogruppen im Anionen-Austauscher-Harz sorgen, erfolgt hierbei die Adsorption der negativ geladenen DNA an die Säulenmatrix. Das Waschen mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration dient der Entfernung von RNA, Proteinen und niedermolekularen Verunreinigungen. Die Elution erfolgt hier mit Hilfe eines Puffers mit hoher Salzkonzentration. Durch die darauffolgende Isopropanolfällung wird die Plasmid-DNA aufkonzentriert und entsalzt.

50 µl einer Glycerinkultur (siehe unten), der unter 2.1.1.1 beschriebene Transformationsansatz oder die restlichen 1,5 ml der Minipräparation (siehe Abschnitt 2.1.1.2) wurden über Nacht in 100 ml 2YT-Medium (100 mg/l Ampicillin, Sigma) bei 37°C geschüttelt und danach 10 min bei 4500 rpm (Heraeus Labfuge 400R) zentrifugiert. Die DNA-Gewinnung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 200 µl Elutionspuffer aufgenommen. Zur Stabilisierung wurde der Lösung Na-EDTA (1 mM, Sigma) hinzugefügt.

Für die Herstellung einer Glycerinkultur wurden 10 ml der Übernachtskultur getrennt zentrifugiert, das Sediment wurde in 1 ml Glycerinlösung (Tabelle 5) aufgenommen und jeweils 500 µl wurden bei –20°C bzw. –80°C gelagert.

Tabelle 5: **Medien und Lösungen für die Plasmidpräparation**

<u>2YT- Medium</u>		<u>2YT-Agar</u>	
Bacto-Trypton (DIFCO)	16 g	2YT-Medium	1 l
Hefe-Extrakt (DIFCO)	10 g	Agar (DIFCO)	15 g
NaCl (Sigma)	5 g	Autoklavieren, bei ca. 50°C das entsprechende Antibiotikum	
Millipore-Wasser	ad 1 l	hinzufügen, Platten gießen. Lagerung: 4°C, lichtgeschützt, 8-10 Wochen	
In den entsprechenden Gefäßen autoklavieren			
<u>Antibiotikallösungen</u>		<u>Glycerinlösung</u>	
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	Glycerin (Merck)	50%
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O	Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
Chloramphenicol	50 mg/ml in EtOH	MgCl ₂	10 mM
Lösungen aliquotiert bei –20°C lagern		Sterilfiltrieren, Lagerung 4°C.	
1: 500 einsetzen			

2.1.2 Quantitative und qualitative Analyse von Nukleinsäuren

Die zur quantitativen und qualitativen Analyse von DNA verwendeten Methoden werden in diesem Abschnitt beschrieben: Die photometrische Untersuchung von DNA, die Sequenzierung der DNA sowie der Restriktionsverdau mit geeigneten Enzymen und anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

2.1.2.1 Photometrische Analyse von Nukleinsäuren

Die Absorptionsmessung einer geeigneten DNA-Verdünnung bei 260 nm und 280 nm mit einem Photometer (Gene Quant II, Pharmacia Biotech) wurde zur Gehalts- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren verwendet. Aus der gemessenen Absorption bei 260 nm und dem bekannten Extinktionskoeffizienten (die optische Dichte von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder ~ 33 µg/ml einzelsträngiger Nukleotide, Sambrook et al., 1989) kann die Konzentration mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet werden. Der Quotient von A_{260}/A_{280} – welcher einen Wert für den Proteinanteil darstellt - diente zur Abschätzung der Reinheit der Plasmid-DNA. Angestrebt wurde ein Wert zwischen 1,7 und 2,0.

2.1.2.2 Sequenzanalyse von DNA

Zur Bestimmung der Nukleinsäuresequenz wurde basierend auf dem Didesoxynukleotidverfahren - auch Kettenabbruchmethode genannt - (Sanger et al., 1977) mit dem BigDye-Terminator-Ready-Reaction-Kit (PE Biosystems) eine enzymatische PCR-artige Reaktion durchgeführt. Die hierbei erzeugten Fragmente wurden im ABI-PRSM-310-Genetic-Analyzer über eine Polyacrylamid-Gelmatrix in einer Glasfaserkapillare aufgetrennt und anschließend spektroskopisch ausgewertet.

Das Prinzip dieser Sequenziermethode beruht auf dem Einbau modifizierter Didesoxynukleotide während der PCR-Reaktion, welcher zum Kettenabbruch führt, da den Didesoxynukleotiden die 3'-OH-Gruppe fehlt und somit die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke zum folgenden Nukleotid nicht mehr erfolgen kann. Diese Didesoxynukleotide sind an Farbstoffe gebunden, die ein für die jeweilige Base spezifisches Emissionsspektrum aufweisen und somit eine spektroskopische Auswertung der erhaltenen Fragmente ermöglichen.

Der Ansatz für die Sequenzierungs-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Minipräp-Plasmid-DNA	5 µl
Primer	0,5 µM
BigDye-Terminator-Reaktionsgemisch	4 µl
Lichrosolv-Wasser (Merck)	ad 20 µl

Für das Primerdesign wurde auf eine Länge von 18-26 Nukleotiden mit einem G oder C am Ende und das Erreichen der optimalen Schmelztemperatur von 55°C geachtet. Die PCR wurde in einem T3-Thermocycler (PE Biosystems) durchgeführt.

Nach 5-minütigem Erhitzen auf 95°C zur vollständigen Denaturierung der DNA wurde der folgende Zyklus 25 mal wiederholt:

96°C	10 sec
50°C	5 sec
60°C	4 min

Nach Durchlaufen der Zyklen wurde der Ansatz auf 4°C gekühlt und das Reaktionsgemisch anhand des DyeEx-Spin-Kits (Qiagen), wie vom Hersteller angegeben, gereinigt. Hierbei werden die unverbrauchten Nukleotide und Farbstoffe mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie über Säulen von den PCR-Fragmenten getrennt. Nach der Zentrifugation befinden sich die größeren DNA-Stränge im Eluat, die restlichen Bestandteile werden in der Gelmatrix zurückgehalten. Im Anschluss an einen 2-minütigen Denaturierungsschritt der DNA im Eluat bei 95°C erfolgte die Analyse im ABI-PRISM 310. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Wisconsin-Package-Software, die Elektropherogramme visuell ausgewertet.

2.1.2.3 Restriktionsverdau

Das zu analysierende Plasmid (Mini- oder Maxipräparation) wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (New England Biolabs) nach Angabe des Herstellers für 1-4 Stunden bei der jeweiligen Temperatur inkubiert (Thermocycler, Eppendorf). Bei einem Verdau mit zwei Enzymen wurde ein für beide Enzyme geeigneter Puffer unter Optimalbedingungen eingesetzt (Liste der Enzyme sowie der optimalen Puffer siehe NEB-Katalog). Die Reaktion wurde entweder durch Hitzeinaktivierung und anschließendes Entfernen der Enzyme und Nukleotide mittels des QIAquick-Nucleotide-Removal-Kits (Qiagen) oder durch Zugabe von $\frac{1}{6}$ des Volumens an Ladebuffer (Gensura, enthält 30 mM EDTA) gestoppt. Die unter 2.1.2.4 beschriebene Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse der geschnittenen DNA herangezogen.

2.1.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden lineare DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe durch Wandern im elektrischen Feld (DNA wandert aufgrund Ihre negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode) aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit steht hierbei im reziproken Verhältnis zur Größe. In Abhängigkeit von der erwarteten Bandengröße können die Konzentration des Agarosegels sowie die Laufzeit variiert werden. Je kleiner die Fragmentgröße, umso höher sollte die gewählte Agarosekonzentration sein. Diese Methode wird standardmäßig zur Identifizierung, Reinigung und Trennung sowie zur präparativen Isolierung linearer DNA-Fragmente verwendet (Sambrook et al., 1989). Die Größe der erhaltenen Banden wird anhand von DNA-Molekulargewichtsstandards bestimmt.

Entsprechend der benötigten Gelmenge und -konzentration wurde die Agarose (Gibco BRL) in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) in der Mikrowelle (M 760, Phillips) aufgekocht und bei Raumtemperatur auf 50-60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 0.1 µg/ml Ethidiumbromid wurde das Gel gegossen und nach dem Erstarren in die mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die mit Ladebuffer versetzten DNA-Proben (siehe Abschnitt 2.1.2.3) sowie der DNA-Molekulargewichtsmarker wurden in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von 60-120 V angelegt. Nach 1-2 h erfolgte die Auswertung des Trennmusters bei 302 nm (UV-Licht; Herolab 2020). Diese Wellenlänge regt das in die DNA-Doppelstränge interkalierende Ethidiumbromid zur Fluoreszenz an.

2.1.3 DNA-Reinigung

Zum Entfernen zu hoher Salzkonzentrationen, inkomplett verdauter Plasmidstücke oder Proteinverunreinigungen (Restriktionsenzymen, alkalischen Phosphatasen, Polymerasen etc.) aus den DNA-Präparationen werden unterschiedliche Methoden angewandt, die hier im einzelnen beschrieben werden.

2.1.3.1 Ethanolfällung

Zur Verringerung der Salzkonzentration sowie zur Konzentrierung der DNA wird die DNA in Gegenwart einwertiger Kationen in Ethanol gefällt, gewaschen und getrocknet und das Präzipitat anschließend in der geeigneten Menge Wasser aufgenommen.

Nach Zugabe von 3 M Natriumacetat (Sigma) pH 5,2 (1/10 des Volumens der DNA-Lösung) sowie von absolutem Ethanol (Riedel-de-Haen) (das 2,5 fache des Volumens der DNA-Lösung) wurde die DNA-Lösung kräftig gemischt und zur DNA-Fällung 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert (EBA 12, Hettich-Zentrifugen). Das DNA-Sediment wurde vorsichtig mit Ethanol (70%) gewaschen, um die restlichen Salze zu entfernen. Im Anschluss an den nächsten Zentrifugationsschritt (15 min 13000 rpm, EBA 12, Hettich-Zentrifugen) wurde das DNA-Sediment in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in dem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

2.1.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen) verwendet. Mit Hilfe dieser Technik können DNA-Fragmente zwischen 50 bp und 50 kb isoliert werden. Prinzip dieses Elutionssystems ist die Bindung der DNA an Silikagel-Partikel (Qiaex) in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze (NaJ oder NaClO₄). Diese Reagenzien bewirken die Auflösung der Agarose sowie eine Veränderung der Wasserstruktur und erleichtern so die Bindung der DNA an die Silikagel-Partikel.

Die zu isolierende DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell so exakt wie möglich aus dem präparativen Agarosegel herausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen) extrahiert. Die Elution erfolgte je nach Größe der DNA-Bande mit 30-50 µl Wasser.

2.1.3.3 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI-Extraktion)

Ziel dieser Methode (Wallace, 1987) ist es, Proteine und andere Verunreinigungen aus der DNA-Lösung zu entfernen. Sie wird meist im Anschluss an eine PCR (siehe Abschnitt 2.1.6) angewandt. Phenol fällt als denaturierendes Reagenz Proteine, die sich daraufhin in der Interphase zwischen der organischen Phenol-Phase und der wässrigen DNA-Phase konzentrieren. Das Chloroform dient der Stabilisierung der Phasengrenze sowie zur Verstärkung des denaturierenden Effekts. Die wässrige DNA-haltige Phase wird abgenommen, Protein- und Phenolphase werden verworfen. Nach vollständiger Phenolentfernung mittels Chloroform wird die DNA mit der Ethanolfällung (siehe Abschnitt 2.1.3.1) konzentriert.

Nach zweimaligem Ausschütteln der DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen einer mit Tris-EDTA-Puffer gesättigten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1; V/V)-Lösung (GibcoBRL) und einem jeweils anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min, 13000 rpm, EBA 12, Hettich-Zentrifugen) wurde die obere, wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform

versetzt, ausgeschüttelt und für 5 min zentrifugiert (EBA 12, Hettich-Zentrifugen). Aus der oberen Phase wurde die DNA mit Ethanol gefällt (siehe Abschnitt 1.3.1).

2.1.4 Isolierung von RNA

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter möglichst RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden i) immer Einmalhandschuhe getragen, ii) alle Glasgeräte bei 180°C über Nacht „gebacken“, alle übrigen Geräte wurden autoklaviert, iii) nur RNase-freie Einmalplastikwaren verwendet und iv) alle Lösungen mit DMPC-behandeltem Wasser (siehe Tabelle 7) angesetzt. DMPC (Dimethylpyrocarbonat) ist ein spezifischer RNase-Inhibitor, der mit den Histidin-Resten von Proteinen reagiert und somit die RNasen inaktiviert.

2.1.4.1 *Isolierung von RNA aus Zelllysaten*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten erfolgte mit dem TRIzol-Reagenz (GibcoBRL) nach Angaben des Herstellers. Für die Gewinnung von Zelllysaten aus einer 25-cm²-Flasche wurde 1 ml TRIzol eingesetzt. Die isolierte RNA (40-50 µg/25-cm²-Flasche) wurde in DMPC-Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Die Zelllysate verschiedener endothelialer Zelllinien sowie glatter Muskel-Zelllinien wurden freundlicherweise von Frau Uhlenbrock, Aventis Pharma, zur Verfügung gestellt.

2.1.4.2 *Isolierung von RNA aus tierischen Organen*

Die Isolierung von RNA aus tierischem Gewebe wird durch die hohen Mengen an genomischer DNA erschwert. Diese stellt besonders bei qualitativen und quantitativen RNA-Analysen mittels RT-PCR (siehe Abschnitt 2.1.7) ein Problem dar. Genomische DNA wird bei einer PCR direkt als Matrize genutzt, ohne dass eine Umschreibung in cDNA mittels RT-Reaktion erforderlich wäre. Da genomische DNA die gesamte Erbinformation besitzt, verfälschen diese Verunreinigungen die Expressionsanalysen auf RNA-Ebene mittels PCR.

Die Prüfung auf Verunreinigung der RNA durch genomische DNA erfolgte mittels PCR mit dem GC-Melt Kit. Hierfür wurden 500 ng der isolierten RNA direkt eingesetzt. Die PCR wurde mit den folgenden Oligos, die für den Ratten-GPR 19 (AccNr.U65417) kodieren, durchgeführt: 1) vorwärts 5'-CCTCTGAGCTTCAAGGTGCCAGAG-3' und 2) rückwärts 5'CCGTCTTCACCTTGGTCCTGGGG-3'. Die PCR-Bedingungen wurden wie in Abschnitt 2.1.6.2 beschrieben gewählt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.1.2.4). Im Falle einer Verunreinigung durch genomische DNA war eine Bande bei 625 bp erkennbar.

Die für Zelllysate angewandte Isolierung mittels TRIzol erwies sich für die Isolierung von RNA aus Geweben als ungeeignet, da hier starke Kontamination mit genomischer DNA auftrat (Abbildung 7, Bande 8). Daher wurden mehrere kommerziell erwerbliche Kitsysteme auf ihre Tauglichkeit zur RNA-Isolierung aus Geweben getestet. Dabei werden Verunreinigungen mit

genomischer DNA entweder durch Zusatz von DNase (DNaseDau; DNase I, Qiagen) oder durch Filtration mit spezifischen Säulen entfernt. Folgende Kitsysteme wurden getestet: High-Pure-RNA-Tissue-Kit (Roche), Micro-to-Midi-Total-RNA-Purification-System (Invitrogen), RNeasy-Maxi-Kit (Qiagen), RNeasy-Midi-Kit, RNA/DNA-Maxi-Kit (Qiagen).

Die Isolierung wurde wie von den jeweiligen Herstellern angegeben durchgeführt. Als Testgewebe wurde Nierengewebe einer Wistar-Ratte verwendet. In Abbildung 7, Banden 1-9, sind die Ergebnisse der PCR mit den verschiedenen RNA-Präparationen dargestellt. Alle verwendeten Kitsysteme zeigten eine deutlich niedrigere Kontamination der RNA mit genomischer DNA als die mit TRIzol isolierte RNA (Bande 8). Bis auf den High-Pure-RNA-Tissue-Kit von Roche (Bande 6) und den RNeasy-Maxi-Kit von Qiagen (Bande 4) wiesen jedoch alle weiteren RNA Präparationen geringe Mengen an genomischer DNA auf (Banden 1-3; 5; 7).

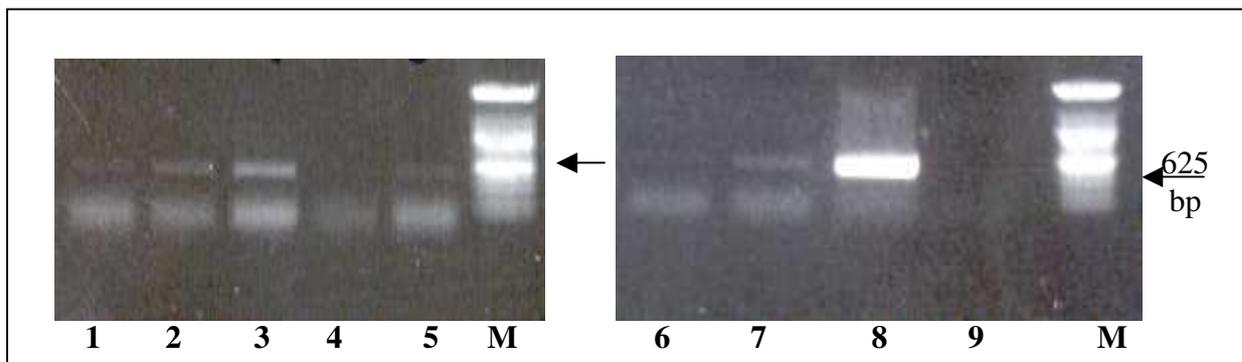


Abbildung 7: **Kontamination mit genomischer DNA in verschiedenen RNA-Präparationen.** 500 ng Gesamt-RNA wurden mittels PCR auf Kontamination mit genomischer DNA getestet. Eine Bande bei 625 bp deutet auf eine Kontamination hin. Die RNA wurde mit folgenden Systemen isoliert: 1: RNeasy-Midi-Kit (Qiagen); 2: RNA/DNA-Maxi-Kit (Qiagen); 3: Micro-to-Midi-Total-RNA-Purification-System (Invitrogen); 4: RNeasy-Maxi-Kit (Qiagen); 5: RNA/DNA-Maxi-Kit (Qiagen) mit DNaseDau; 6: High-Pure-RNA-Tissue-Kit (Roche); 7: TRIzol mit DNaseDau; 8: TRIzol; 9: neg. Kontrolle; M: 500-kb-Marker

Aufgrund der deutlich größeren Gewebemengen, die beim RNeasy-Maxi-Kit/Säule aufgearbeitet werden können (bis zu 1 g versus 25 mg) wurde für die weitere RNA-Isolierung der RNeasy-Maxi-Kit verwendet:

Hier werden die Gewebeproben in einem Guanidinthiocyanat-haltigen Puffer lysiert und homogenisiert. Guanidinthiocyanat als stark denaturierendes Reagenz ermöglicht durch Inaktivierung der RNasen die Isolierung von intakter RNA. Nach Ethanolzugabe wird die Gesamt-RNA auf einer Silikatgel-Membran der Extraktionssäulen zurückgehalten, mehrere Waschschritte dienen zur Entfernung weiterer Zellbestandteile. Die Elution der RNA erfolgt mit RNase-freiem Wasser. Wird RNA aus Geweben isoliert, die große Mengen an die Isolierung erschwerenden kontraktilen Proteinen, Geweben und Kollagen enthalten (z.B. Herzgewebe),

wird nach dem Homogenisieren ein Proteinase-Verdau-Schritt (mit Proteinase K, Qiagen) eingefügt, um diese Proteine zu entfernen und eine effektive Isolierung der RNA zu gewährleisten.

Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die eingesetzten Gewebemengen lagen zwischen 400 und 1000 mg, das Homogenisieren erfolgte mit dem Ultra-Turrax-T25 (IKA, Labortechnik). Die Ausbeute betrug in Abhängigkeit vom verwendeten Gewebe zwischen 0,5 und 2 mg Gesamt-RNA. Die Quantifizierung der RNA erfolgte spektrometrisch (siehe Abschnitt 2.1.2.1), zur Beurteilung der RNA-Qualität wurde eine RNA-Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.1.5.3) durchgeführt.

In Abbildung 8 sind die charakteristischen Banden der 15S- und 18S-rRNA dargestellt. Weitere oder verschmierte, nicht differenzierbare Banden weisen auf eine Zersetzung oder Kontamination der RNA hin.

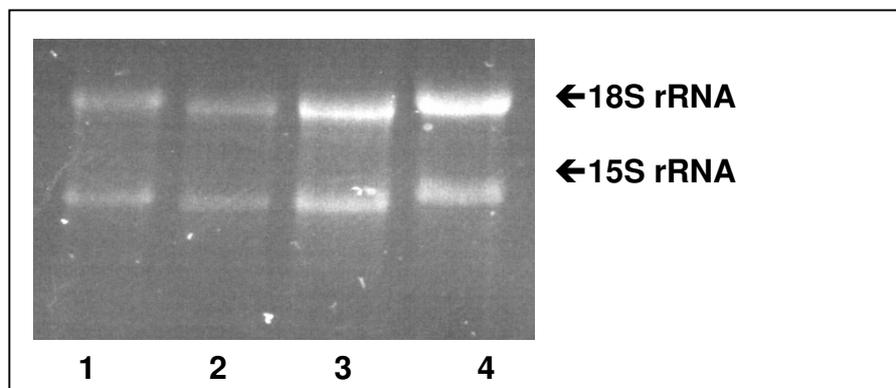


Abbildung 8: **Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA.** 4 unterschiedliche RNA-Proben (5 µg) wurden zur Qualitätskontrolle auf einem 1% Agarose/Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt 1: Hirn, Wistarratte; 2: Herz, Wistarratte; 3: Niere, Wistarratte; 4: Aorta, Wistarratte.

2.1.5 Northern Blot

Beim Northern Blot handelt es sich um ein Verfahren, bei dem RNA nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylonmembran transferiert und fixiert wird. Die Elektrophorese erfolgt unter denaturierenden Bedingungen, um potentiell ausgebildete Sekundärstrukturen der einzelsträngigen RNA aufzulösen, der Transfer der RNA vom Gel auf die Membran wird durch die Kapillarkapillareffekte des Filterpapiers (Kapillar-Blot) bewirkt. Mit nicht-radioaktiven, spezifischen Sonden werden die Membranen hybridisiert und anschließend immunologisch detektiert. Ein Northern Blot kann mehrfach verwendet und mit verschiedenen Proben hybridisiert werden.

2.1.5.1 Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Die Herstellung der Sonden erfolgte mit dem DIG-RNA-Labeling-Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wird nicht mit radioaktiven Isotopen markiert, sondern mit Digoxigenin, einem Hapten aus Digitalispflanzen. Im Vergleich zu anderen Haptenen (z.B. Biotin) werden hier Probleme mit endogenem Hintergrund deutlich reduziert.

Die kodierenden Bereiche des rS1P₅-Rezeptors und des hGPR63 sowie die Nukleotide 279-1197 des hS1P₅-Rezeptors wurden in den Vektor pSPT 18 (Roche) subkloniert (siehe Abschnitt 2.1.8). Die Konstrukte wurden linearisiert (rS1P₅ und hGPR63 mit *Hind* III, hS1P₅ mit *Bam*H I) und die Vollständigkeit der Linearisierung wurde auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.1.2.4) überprüft. Das linearisierte Plasmid wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 2.1.3.3) und einer Ethanol-fällung (siehe Abschnitt 2.1.3.1) unterzogen, bevor es im folgenden Reaktionsansatz mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase mit Digoxigenin-Uracil markiert wurde (in-vitro-Transkription):

Linearisierte DNA	1 µg
NTP-Markierungs-Gemisch	2 µl
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
T7-RNA-Polymerase	2 µl
Wasser (RNase-frei)	ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8) abgestoppt. Mit DMPC-Wasser wurde der Markierungsansatz auf 100 µl aufgefüllt.

2.1.5.2 Tüpfeltest

Nach der Markierungsreaktion wurde mit Hilfe des Tüpfeltests die Ausbeute der Markierungsreaktion geprüft.

Hierfür wurden von der Sonde sowie von der DIG-markierten Kontroll-RNA aus dem DIG-RNA-Labeling-Kit eine Verdünnungsreihe (Tabelle 6) hergestellt und jeweils 1 µl der Verdünnungen fünf bis zwölf (10 pg/µl-0 pg/µl) wurde auf eine Nylonmembran aufgetragen:

Tabelle 6: **Verdünnungsschema für den Tüpfeltest bei DIG-markierten RNA-Sonden**

Gefäß Nr.	RNA [μ l] aus Gefäß Nr.	DMPC-Wasser	Gesamt-volumen	Verdünnung	End-konzentration
1	2 μ l aus Original/Kontrolle	198 μ l	200 μ l	1:100	1 ng/ μ l
2	15 μ l aus Gefäß Nr. 1	35 μ l	50 μ l	1:3.3	300 pg/ μ l
3	5 μ l aus Gefäß Nr. 1	45 μ l	50 μ l	1:10	100 pg/ μ l
4	5 μ l aus Gefäß Nr. 2	45 μ l	50 μ l	1:10	30 pg/ μ l
5	5 μ l aus Gefäß Nr. 3	45 μ l	50 μ l	1:10	10 pg/ μ l
6	5 μ l aus Gefäß Nr. 4	45 μ l	50 μ l	1:10	3 pg/ μ l
7	5 μ l aus Gefäß Nr. 5	45 μ l	50 μ l	1:10	1 pg/ μ l
8	5 μ l aus Gefäß Nr. 6	45 μ l	50 μ l	1:10	0,3 pg/ μ l
9	5 μ l aus Gefäß Nr. 7	45 μ l	50 μ l	1:10	0,1 pg/ μ l
10	5 μ l aus Gefäß Nr. 8	45 μ l	50 μ l	1:10	0,03 pg/ μ l
11	5 μ l aus Gefäß Nr. 9	45 μ l	50 μ l	1:10	0,01 pg/ μ l
12	0	50 μ l	50 μ l	-	0

Die Membran wurde durch Auflegen auf ein mit 2 x SSC getränktes Whatman-Papier befeuchtet, die RNA mit dem UV-Stratalinker 2400 (Stratagene) auf der Membran fixiert und anschließend immunologisch wie in Abschnitt 2.1.5.5 beschrieben detektiert. Anhand der bekannten Konzentrationen der Kontroll-RNA ließ sich die Menge an markierter RNA abschätzen (Abbildung 9). Wurden die Sonden bis zum 9. Verdünnungsschritt detektiert, galten sie als sehr gut. Für die Hybridisierung wurden ca. 100 ng Sonde/ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

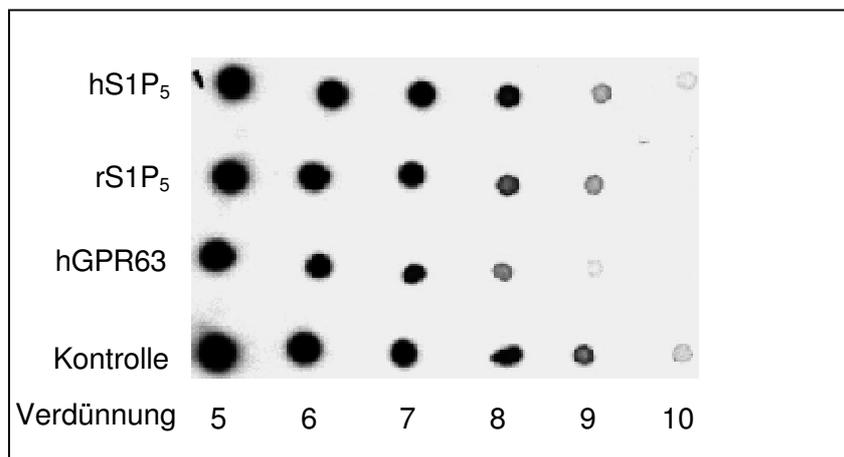


Abbildung 9: **Tüpfeltest mit verschiedenen DIG-markierten RNA-Sonden.** Verdünnungsreihen der Sonden sowie der Kontroll-RNA wurden auf eine Nylonmembran aufgetragen, fixiert und detektiert.

2.1.5.3 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Um jegliche RNase-Kontamination zu vermeiden, wurden alle beteiligten Materialien (Gelkammer, Käbme etc.) im voraus mit RNase-Zap (Sigma) behandelt.

Zunächst wurde folgendes denaturierendes RNA-Agarosegel hergestellt:

Agarose (GibcoBRL)	1,2 g
10 x MOPS-Puffer	12 ml
DMPC-Wasser	101,4 ml
37%iges Formaldehyd (Merck)	6,6 ml

Die ersten drei Bestandteile wurden in der Mikrowelle aufgeköcht. Bei ca. 60°C wurde der Formaldehyd hinzugefügt und das Gel gegossen. Die RNA-Proben sowie die RNA-Größenmarker (Roche) wurden mit dem 2-3-fachen Volumen an Ladepuffer (Sigma) versetzt und bei 65°C für 10 min denaturiert. Da der Ladepuffer kein Glycerin enthält, wurden die Proben trocken geladen, d.h. der Laufpuffer (1 x MOPS; 3-(N-Morpholin)propansulfonsäure) wurde zunächst nur bis zur Unterkante des Gels in die Kammer gegossen. Nach 10 min bei 60 V waren die Proben komplett in das Gel gelaufen, und die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x MOPS aufgefüllt. Die anschließende Gelelektrophorese erfolgte bei 15 V über Nacht oder alternativ bei 60 V für ca. 4 h.

Tabelle 7: **Stammlösungen für den Northern Blot**

<u>DMPC-Wasser</u>		<u>10 x MOPS- Puffer</u>	
DMPC (Sigma)	1 ml	MOPS (Sigma)	41,86 g
Millipore-Wasser	ad 1 l	Na-Acetat (Merck)	4,1 g
2 h Inkubation (Rühren);		EDTA 0,5 M (Sigma)	20 ml
Autoklavieren zum Zerstören des		Millipore-Wasser	ad 1 l
DMPC		Auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren	
<u>10% SDS- Lösung</u>			
SDS (Sigma)	100 g		
DMPC-Wasser	ad 1 l		

2.1.5.4 Kapillarblot

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in 20 x SSC-Puffer (Salin-sodium-citrat-Puffer, Sigma) für 10 min äquiliбриert. Die Nylonmembran (Roche) sowie das Whatman-Papier wurden auf die jeweilige Größe des Gels zugeschnitten. Anschließend wurde die Blotapparatur wie in Abbildung 10 dargestellt aufgebaut. Dabei wurde das Gel seitenverkehrt mit der RNA-Seite nach unten auf das Whatman-Papier gelegt, welches direkt in den Transferpuffer (20 x SSC) eintauchte. Nach Entfernung der Luftblasen wurden die Membran (Roche), weitere drei Lagen

Whatman-Papier, saugfähiges Papier und das Gewicht aufgelegt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei RT. Durch UV-Crosslinken (UV-Stratalinker, Stratagene) wurde die RNA auf der Membran fixiert, kurz mit DEPC-Wasser gewaschen und in Folie eingeschweißt bei 4°C bis zur Hybridisierung gelagert.

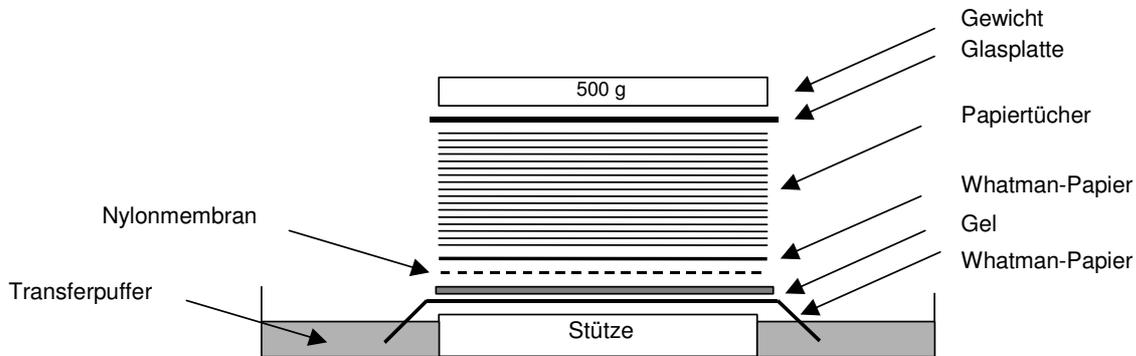


Abbildung 10: **Aufbau einer Northern-Blot-Blotting-Apparatur.** Modifiziert nach Sambrook et al. (1989).

2.1.5.5 Hybridisierung, Waschen und Detektion

Hybridisierung, Waschen und Detektion wurden mit den folgenden Reagenzien der Firma Roche durchgeführt: DIG-Easy-Hyb, DIG-Wash-and-Block-Buffer-Set, Anti-Digoxigenin-AP-Fab-fragments, CDP-Star.

Das Prinzip der Detektion beruht auf einer enzymatischen Umsetzung des CPD-Star-Substrates durch das RNA-Antikörper-Konjugat (Dephosphorylierung durch eine alkalische Phosphatase). Das entstehende metastabile Phenolat anion zerfällt und emittiert dabei Licht (Maximum bei 477 nm).

Hybridisierung, Waschen und Detektion erfolgte nach folgendem Schema (Tabelle 8):

Tabelle 8: **Wasch- und Detektionsschema beim Northern Blot**

1. Prähybridisierung	DIG-Easy-Hyb, 15 ml	30 min, 68°C
2. Hybridisierung	DIG-Easy-Hyb, 10 ml mit 100 ng Sonde/ml	über Nacht, 68°C
3. Niedrig-Stringenz-Waschen	„Niedrig-Stringenz“-Waschpuffer 20 ml	2 x 5 min, RT,
4. Hoch-Stringenz-Waschen	„Hoch-Stringenz“-Waschpuffer 20 ml	2 x 15, 68°C,
5. Äquilibration	Waschpuffer, 20 ml	2 min, RT, Schütteln
6. Blockierung	Blockierungslösung, 20 ml	30 min, RT,
7. Inkubation	Blockierungslösung, 10 ml mit Antikörper (1:10000)	30 min, RT, Schütteln
8. Waschen	Waschpuffer, 20 ml	2 x 15 min RT,
9. Äquilibration	Detektionspuffer, 15 ml	5 min, RT, Schütteln
10. Detektion	CPD-Star (1:100 in Detektionspuffer)	5 min, RT

Schritt 1 und 2 wurden in Hybridisierungsröhrchen in einem Hybridisierungsofen durchgeführt. Die Sonde wurde bei 100°C für 5 min denaturiert und anschließend in den auf 68°C

vorgeheizten DIG-Easy-Hyb-Puffer gegeben. Die Hybridisierungsröhrchen wurden mit Hilfsmembranen bestückt, in die die Membran eingerollt wurde.

Die Schritte drei und fünf bis acht wurden auf einem Schüttler (Celloshaker Variospeed, Biotec-Fisher) durchgeführt. Das Hoch-Stringenz-Waschen erfolgte in einem Köttermann-Schüttelwasserbad.

Für Schritt zehn wurde die Membran mit der RNA-Seite nach oben auf eine Folie gelegt, mit CPD-Star beträufelt und anschließend luftblasenfrei eingeschweißt. Das Chemilumineszenzsignal wurde im Lumiimager (Roche) detektiert (1–5 min Exposition).

Die Antikörperverdünnung sowie die CPD-Verdünnung wurden immer frisch angesetzt.

Tabelle 9: **Waschpuffer Northern Blot**

„Hoch-Stringenz“-Waschpuffer		„Niedrig-Stringenz“-Waschpuffer	
20 x SSC (Sigma)	5 ml	20 x SSC (Sigma)	100 ml
10% SDS (Sigma)	10 ml	10% SDS (Sigma)	10 ml
DMPC-Wasser	ad 1 l	DMPC-Wasser	ad 1 l

2.1.5.6 Sondenentfernung (Strippen)

Zum Entfernen einer Sonde von einem hybridisierten Blot wurde dieser kurz in DMPC-Wasser gewaschen und danach 2 x 60 min bei 80°C im Schüttelwasserbad in folgendem Puffer gewaschen: 50% Formamid; 5% SDS; 50 mM Tris-HCl; pH 7,5. Nach einem kurzen Waschschrift (2 x SSC) konnte der Blot erneut verwendet werden.

2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction, Saki et al., 1988) stellt ein enzymatisches *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherungen von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen dar. Mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen werden DNA-Einzelstränge zu komplementären Doppelsträngen polymerisiert. Die PCR gliedert sich in drei Schritte: Während der Denaturierungsphase wird der zu amplifizierende Doppelstrang der DNA durch Hitze getrennt. An diese einzelsträngige Matrize lagern sich bei niedriger Temperatur die *Primer* (synthetische Oligonukleotide als Startermoleküle, die komplementär zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Nukleinsäure sind) an (Hybridisierungsphase). Vom 3'-Ende dieser Oligos ausgehend, findet im dritten Schritt (häufig bei 72°C) die Synthese mit Hilfe der Polymerase statt. Die vielfältige Nutzung der PCR umfasst unter anderem die Klonierung (siehe Abschnitt 2.1.8), die qualitative und quantitative (siehe Abschnitt 2.1.6.4) Expressionsanalyse, die Mutagenese, das Einführen spezifischer Sequenzen (HA-Tag, Schnittstellen) sowie die Markierungsreaktion (siehe Abschnitt 2.1.5.1).

Zur qualitativen Expressionsanalyse wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.1.2.4) aufgetrennt und visuell analysiert. In Tabelle 10 sind die für die Expressionsanalyse verwendeten Primer und Kits aufgelistet.

Tabelle 10: **Primer für die Expressionsanalyse**

Rezeptor (Acc.Nr)	Vorwärts 5' nach 3' [bp - bp]	Rückwärts 5' nach 3' [bp - bp]	Fragmentgröße [bp]	Verwendeter PCR-Kit
hS1P ₁ (M331210)	112 - 131 GCGCGGACAAGGAGAACAGC	579 - 558 CGGTGGAGCAGCTGGACAGCGC	467	AmpliTaq Gold
hLPA ₁ (U808811)	23 - 42 CCCTGTAATTTACAGCCCC	393 - 374 GGCTGGTGTCAATGAGGCC	370	AmpliTaq Gold
hS1P ₃ (X83864)	215 - 236 CCGCATGTACTTTTTATTGGC	705 - 677 CCGAGTTGTGTGGTTGGCCACCTTACGG	491	AmpliTaq Gold
hLPA ₂ (AF011466)	107 - 136 GGCACTGGGGGCTGACCGTCAGCGTGCTGG	539 - 519 GCGTGAGCAGCGGTCCAGGGC	432	AmpliTaq Gold
hS1P ₂ (AF034780)	66 - 85 GGAGACGCTGGAAAACGCAGG	423 - 403 GCCATACAGCTTGACCTTGGC	337	AmpliTaq Gold
hS1P ₄ (AJ000479)	203 - 226 GGCGGCCATCACCAGCCACATGCG	723 - 699 CCGCTGGGCGTGGGGCCTTCTGCC	513	AmpliTaq Gold
hLPA ₃ (AF127138)	46 - 66 GGAGCAACTGATACTGTCTCG	524 - 505 GGCAGAGATGTTGCCAGAGGC	468	AmpliTaq Gold
hS1P ₅ (AC073749)	166 - 185 GCCGTGTTGTTGGTCTGCTCGG	698 - 671 GCAGTCCCGGGCCGTGCCGGCAGGCGCC	538	GC Melt
hGPR45 (AF118266)	220-226 GGGCAACACTGTGGTCTGCATCATCG	590- 563 GGGGCCCGCGCCGGCACCTCCACCAGCG	370	AmpliTaq Gold
hGPR63 (AB030566)	157- 180 CCCCTGGTTTGAGTTCCTTGACC	718 - 694 GGTAGCCTGGATTGTTGTGTACC	561	AmpliTaq Gold

Für die spezielle Expressionsanalyse in Zelllysaten erwies sich eine andere Primerkombination für LPA₁ als ideal. Das 480 bp-große PCR-Stück wurde mit den folgenden Primern generiert: 5'-CCCAGTTCACAGCCATGAATGAACC-3' (vorwärts) sowie 5'-CCACAATGACCACCAC-TACCCGCCGG-3' (rückwärts).

2.1.6.1 PCR mit der Taq-Polymerase

Zur Expressionsanalyse sowie zur Klonierung wurde standardmäßig eine PCR mit dem AmpliTaq-Gold-Polymerase-Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Die mit der Taq-Polymerase gebildeten PCR-Produkte haben einen 3'-A-Überhang und können so - falls sie zur Klonierung generiert werden - direkt in den TA-Klonierungsvektor ligiert werden (siehe Abschnitt 2.1.8).

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 x AmpliTaq Gold-Reaktionspuffer	5 µl
Primer (10 pmol/µl)	je 1 µl
DNA-Matrize (Plasmid, cDNA, PCR-Stück)	50-100 ng
dNTP-Mix (1,25 mM/ dNTP)	8 µl
Wasser	ad 50 µl
Ampli Taq Gold-Polymerase	0,5 µl

Das PCR-Programm (für die Expressionsanalyse optimiert) umfasste folgende Schritte:

Nach einem 10-minütigen Erhitzen auf 95°C (Denaturierung der DNA, Aktivierung der AmpliTaq Gold-Polymerase) wurde der folgende Zyklus 35 mal wiederholt:

96 °C	1 min
60 °C	1 min
72 °C	1 min

Im Anschluss daran folgte eine Inkubation bei 72 °C für 10 min und ein Abkühlen auf 4 °C.

2.1.6.2 PCR mit dem GC-Melt-Kit

Die Amplifikation GC-reicher Sequenzen (z.B. der S1P₅-Rezeptor) erfordert aufgrund der starken intramolekularen Bindungen, die durch die konventionelle Hitzedenaturierung nicht aufgebrochen werden können und somit das Anlagern der *Primer* unterbinden, den Zusatz basentrennender Reagenzien. Hierfür wurde der GC-Melt-Kit (Clontech) mit folgendem PCR-Ansatz eingesetzt:

5 x GC cDNA-PCR-Puffer	10 µl
Vorwärts- <i>Primer</i> (10 pmol/µl)	1 µl
Rückwärts- <i>Primer</i> (10 pmol/µl)	1 µl
DNA-Matrize (Plasmid, cDNA, PCR-Stück)	50-100 ng
50 x dNTP-Mix (10 µM/ dNTP)	1 µl
Wasser	ad 50 µl
50 x Advantage-GC-cDNA-Polymerase-Mix	1 µl

Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis angesetzt und nach einem 1-minütigen Erhitzen auf 94 °C zur Denaturierung der DNA dem folgenden Zyklus 35 mal unterzogen:

94 °C	30 sec
68 °C	3 min

Im Anschluss daran folgte eine Inkubation bei 68 °C für 3 min und ein Abkühlen auf 4 °C.

2.1.6.3 PCR mit der Pfu-Polymerase

Die *Pfu*-Polymerase (Promega) besitzt eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität und gehört damit zu den *proof-reading*-Enzymen, d.h. die Amplifikation erfolgt mit einer sehr geringen Fehlerrate. Daher wird dieses Enzym in erster Linie dann eingesetzt, wenn das PCR-Produkt möglichst fehlerfrei sein sollte (Klonierungen, Umklonierungen zur funktionellen Analyse). Da die *Pfu*-Polymerase *blunt ends* in den PCR-Produkten produziert, muss hier beim Ligieren auf spezielle *blunt-end*-Klonierungsvektoren (siehe Abschnitt 2.1.8) zurückgegriffen werden.

Der Ansatz (50 µl) für eine *Pfu*-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

10 x <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	5 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
DNA-Matrize (Plasmid, cDNA, PCR-Stück)	50-100 ng
dNTP-Mix (2,5 mM/dNTP)	5 µl
Wasser	ad 50 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase (5 u/µl)	1 µl

Der Reaktionsansatz erfolgte auf Eis, und nach einem 1-minütigen Erhitzen auf 95°C zur Denaturierung der DNA wurde der folgende Zyklus 25 mal wiederholt:

94 °C	1 min
50 °C	1 min
72 °C	3 min

Im Anschluss daran folgte eine Inkubation bei 72°C für 10 min und ein Abkühlen auf 4°C.

2.1.6.4 **Echt-Zeit-PCR**

Bei der Echt-Zeit-PCR handelt es sich um eine PCR-Methode, bei der die Menge an gebildetem PCR-Produkt über den gesamten Zeitverlauf (*cycle-by-cycle*) der Reaktion verfolgt wird. Dies erfolgt entweder durch Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green) in die gebildeten DNA-Doppelstränge oder mit Hilfe einer für die zu amplifizierende Sequenz spezifischen TaqMan-Sonde. Im Gegensatz zur konventionellen PCR, bei der das Produkt am Endpunkt der PCR quantifiziert wird, erfolgt bei der Echt-Zeit-PCR die Quantifizierung während der log-linearen Phase. Je höher die Konzentration der Matrize im Reaktionsansatz, umso früher kann das PCR-Produkt detektiert werden. Die an die PCR anschließende Schmelzkurvenaufnahme der gebildeten Produkte kann sowohl zur Identifizierung des Produktes als auch zur Mutationsanalyse verwendet werden.

Echt-Zeit-PCR mit TaqMan-Sonde

Untersuchungen der hGPR63-Genexpression mittels TaqMan-Sonde erfolgten im Labor von Herrn Dr. Ali Ardati (Aventis Pharmaceuticals, Bridgewater, USA). Die Auswahl der Primer und Sonden (Tabelle 11) sowie die Optimierung der Versuchsbedingungen wurden von Dr. Ardati durchgeführt.

Tabelle 11: **Primer und Proben für die TaqMan-PCR**

Primer	Sequenz
GPR63 Vorwärts-Primer	CTCAACACCCTTCGGCACA
GPR63 Rückwärts-Primer	GGCCTGGCTGAGGCATATAC
GPR63 Taqman-Probe	FAM-TGCCTTGAGGATCCATAGCTACCCTGAA-TAMRA

Echt-Zeit-PCR mit SYBR-Green

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Echt-Zeit-PCR dazu verwendet werden, die Expression von Rezeptoren in verschiedenen Tiermodellen auf RNA-Ebene zu quantifizieren. Hierfür wurde die aus Geweben gewonnene RNA (siehe Abschnitt 2.1.4.2) zunächst in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription, siehe Abschnitt 2.1.7). Mit dieser cDNA erfolgte dann die PCR, wobei sowohl die Expression des Zielproteins sowie die des Housekeepinggens

β -Actin (dieses hat ubiquitär das gleiche Expressionsniveau und dient als interner Standard) untersucht wurden.

Die Reaktion wurde mit dem LightCycler-Fast-Start-DNA-Master-SYBR-Green-I-Kit (Roche) im LightCycler (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die in diesem Kit enthaltene FastStart-*Taq*-Polymerase wurde speziell für eine Hot-Start-Reaktion (Aktivierung der Polymerase bei hohen Temperaturen, verhindert unspezifische Amplifikationen vor dem Beginn der PCR) in Glaskapillaren adaptiert. Die Optimierung der Echt-Zeit-PCR wird hier exemplarisch anhand des Urotensin-Rezeptors (der zu Beginn dieser Arbeit noch zu den zu untersuchenden Rezeptoren gehörte) sowie des β -Actin-Gens dargestellt.

Zunächst wurde ein Mastermix wie im Protokoll vom Hersteller angegeben hergestellt, danach die cDNA in den Glaskapillaren vorgelegt und schließlich mit Mastermix auf 20 μ l aufgefüllt. Nach dem Verschließen der Kapillaren wurden diese in den LightCycler-Rotor platziert und die Probe analysiert. Zum Testen verschiedener Oligokombinationen wurde die cDNA anstelle der Oligos in den Mastermix gegeben und die Oligos wurden in den Kapillaren vorgelegt. Die Analyse der gebildeten PCR-Produkte erfolgte entweder mittels Agarosegelelektrophorese (bei der Identifizierung der optimalen Oligo-Kombination) oder mit Hilfe der im Anschluss an die PCR im LightCycler aufgenommenen Schmelzkurve. Da jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur (in der Regel zwischen 80 °C und 90 °C) aufweist, die deutlich höher als die der gebildeten Primerdimeren (meist bei 75 °C) ist, kann diese zur qualitativen Analyse herangezogen werden.

Die Optimierung erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden mindestens sechs Primerkombinationen getestet und anschließend die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches optimiert.

Zum Testen der Primer (mit cDNA aus Nieren-RNA von Wistar-Ratten), die sich an verschiedenen Stellen des Zielproteins anlagern und idealerweise Banden der Größe 250-350 bp liefern, wurde folgendes von Herrn B. Eidenmüller (Aventis Pharma, Frankfurt) standardmäßig eingesetztes PCR-Protokoll verwendet:

Millipore-Wasser	11,6 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 μ l (finale Konzentration: 4 mM)
LightCycler-FastStart SYBR Green I	2 μ l
cDNA	2 μ l
Primer	je 1 μ l (0,5 μ M)

Nach der 10-minütigen Denaturierung der DNA und der Aktivierung der Polymerase bei 95 °C wurde folgender Zyklus 35 mal wiederholt:

95 °C	15 sec
55 °C	5 sec
72 °C	10 sec (hier erfolgte die Detektion der Fluoreszenzintensität)

Im Anschluss daran folgte die Aufnahme der Schmelzkurve zwischen 95 °C und 65 °C und ein Abkühlen auf 40 °C.

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden danach aus der Kapillare durch Zentrifugation in ein Eppendorfgefäß überführt, mit Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel mittels Elektrophorese (siehe Abschnitt 2.1.2.4) aufgetrennt. Die Beurteilung der Anwendbarkeit der Oligokombination erfolgte visuell (eine definierte Bande, kein schmieriger Hintergrund). Kamen verschiedene Kombinationen in Frage, wurden die betreffenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (siehe Abschnitt 2.1.3.2), mittels PCR nachamplifiziert, erneut eluiert und anschließend die Konzentration der PCR-Stücke photometrisch bestimmt. Mit jedem dieser PCR-Produkte wurde jeweils eine Verdünnungsreihe (0,002 – 200 pg/20 µl) pipettiert und mit den korrespondierenden Oligos eine Kalibriergerade mit LightCycler erstellt. Die hier erhaltene Steigung (m) kann mit der folgenden Formel in die Amplifikationseffizienz (E) umgerechnet werden:

$$E = 10^{-1/m}$$

Die Amplifikationseffizienz gibt an, um das Wievielfache das PCR-Produkt pro Zyklus vervielfältigt wird und sollte idealerweise bei 2 liegen. Die Oligokombination, die diesem Wert am nächsten kam, wurde dann für die weiteren Optimierungsschritte verwendet.

Tabelle 12: **Primer für die LightCycler-Echtzeit-PCR**

Oligo	Sequenz
Ull-vorwärts	5'GGCCACGGGTGTCATCGGGGCAGTGC-3'
Ull-rückwärts	5'GGCTCTTAGAGCCCCTGCGG-3'
β-Actin vorwärts	5'TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'
β-Actin rückwärts	5'CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

Mit diesen Oligokombinationen und dem aufgereinigtem korrespondierenden PCR-Produkt wurde noch der Effekt von DMSO-Zugabe zum Reaktionsgemisch getestet sowie die optimale Mg-Konzentration (zwischen 1 und 6 mM) unter Beibehaltung der Zyklus-Bedingungen der PCR ermittelt. Hierzu wurden folgende Parameter herangezogen: Amplifikationseffizienz, Präzision, Intraassay- und Interassay-Varianz. Alle Bestimmungen erfolgten vier bis sechs Mal. Zur Bestimmung der Präzision wurden mittels der Kalibriergeraden mehrere Proben bekannter Konzentration quantifiziert und der vom LightCycler ermittelte Wert mit dem wahren Wert verglichen. Die Intraassay-Varianz wurde zwischen mehreren Kalibrierkurven aus einem Mastermix, die im gleichen Lauf erstellt wurden, bestimmt, die Interassay-Varianz aus den Daten mehrerer Kalibrierkurven verschiedener Läufe.

Der Zusatz von DMSO ergab keine deutliche Verbesserung, Mg Konzentrationen von 1 mM, 5 mM und 6 mM lieferten keine bzw. mehrere Produkte. Für 2 mM, 3 mM und 4 mM $MgCl_2$ ergab sich für die einzelnen Parameter das in Abbildung 11 dargestellte Bild:

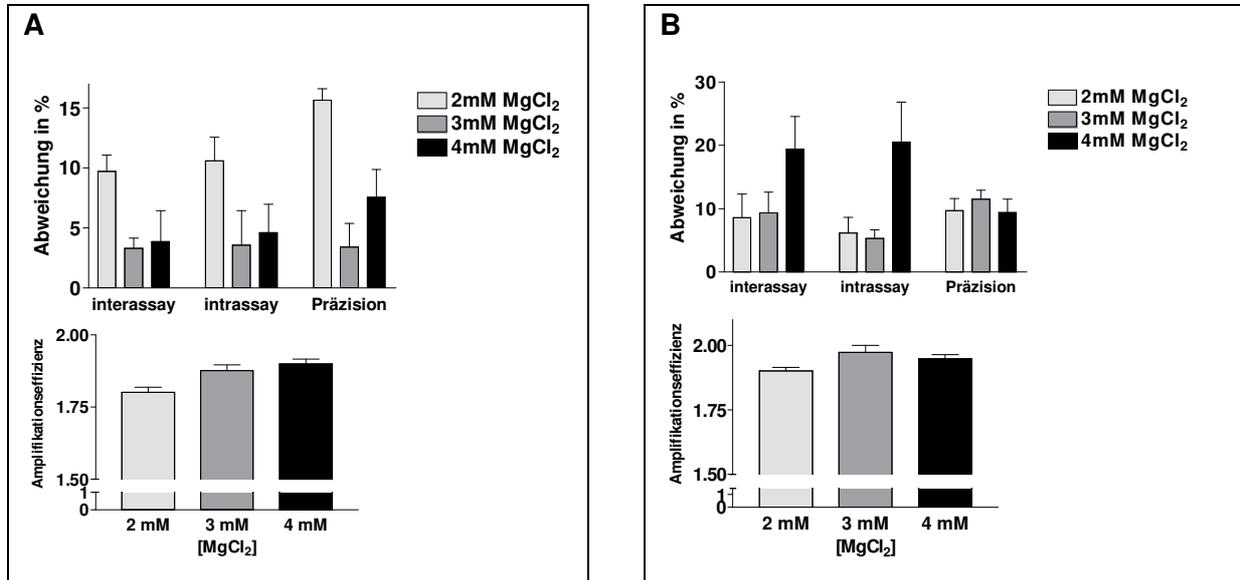


Abbildung 11: Optimierung der $MgCl_2$ -Konzentration bei der RT-PCR am LightCycler.

Für die Urotensin-Amplifikation (Abbildung 11 A) erwies sich 2 mM $MgCl_2$ als völlig ungeeignet, während 3 und 4 mM $MgCl_2$ bei allen Parametern gute Ergebnisse lieferten. Für alle Parameter zusammen ergab sich 3 mM als die optimale $MgCl_2$ -Konzentration.

Im Gegensatz dazu war 4 mM $MgCl_2$ für die β -Actin-Amplifikation völlig ungeeignet (Abbildung 11 B), während hier 2 und 3 mM $MgCl_2$ vergleichbar gute Ergebnisse lieferten. Eine geringe Überlegenheit war bei 2 mM erkennbar, so dass hier die Versuche mit 2 mM $MgCl_2$ durchgeführt wurden.

Zur Expressionsanalyse wurden die Erstellung der Kalibriergerade sowie die Analyse der zu bestimmenden Proben im jeweils gleichen Rotor durchgeführt. Die eingesetzte cDNA-Menge entsprach 200 ng totaler RNA. Sie sollten hierbei mindestens einem Volumen von 2 μ l entsprechen, um Pipettierfehler so gering wie möglich zu halten. Jede cDNA wurde sowohl auf β -Actin-Expression als auch auf die Rezeptorexpression untersucht. Die Expressionsdaten der Rezeptoren wurden dann auf die β -Actin-Werte normalisiert.

2.1.7 Synthese von cDNA aus RNA mittels RT-Reaktion

Bei der RT-Reaktion (*reverse-transcriptase-Reaktion*) wird RNA enzymatisch in cDNA umgeschrieben. Diese kann dann zur Expressionsprofilanalyse auf RNA-Ebene in einer PCR (RT-PCR) sowie als Matrize für Klonierungen genutzt werden. Letzteres ist vor allen Dingen bei intronhaltigen Genen von Vorteil, da hier eine direkte Klonierung aus genomischer DNA nicht möglich ist.

Die cDNA-Synthese erfolgte standardmäßig mit dem ProSTAR First-Strand-RT-PCR-Kit (Stratagene) aus Gesamt-RNA (5 µg) oder kommerziell erwerblicher poly A⁺ mRNA (100 ng). Mit der MMLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) wurde unter Verwendung von oligo-d(t)₁₈-*primern* (diese hybridisieren im Bereich des 3'-Endes der mRNA) die mRNA (ca. 2-4% der Gesamt-RNA) selektiv in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Synthese wurde der Reaktionsansatz (nach Angaben des Herstellers) bei 37°C für 1h inkubiert.

Die cDNA, die für die LightCycler-Analysen verwendet wurde, wurde mit dem 1st-strand-cDNA-Synthes-Kit für RT-PCR (AMV; Roche) hergestellt. Die hier eingesetzte AMV-RT (avian myeloblastis virus reverse transcriptase) hat bei 42°C eine höhere Transkriptionseffizienz als die MMLV-RT. Die Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von 1,6 µg oligo-dT-*primern*.

Zur Expressionanalyse der humanen Rezeptoren mittels PCR wurde kommerziell erworbene cDNA (Invitrogen; Clontech) verwendet.

2.1.8 Klonierung und Subklonierung, Ligation

Zur Klonierung wird standardmäßig das gewünschte DNA-Fragment mittels PCR aus genomischer DNA oder cDNA gewonnen, aufgereinigt und anschließend an den durch die *primer* eingeführten Schnittstellen in einem Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.1.2.3) geschnitten. Die verdauten Fragmente werden mittels Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt und anschließend zur Ligation verwendet.

Die Subklonierung erfolgt durch „Heraustrennen“ des Fragmentes (*insert*) aus dem Plasmid mittels Restriktionsverdau und anschließender Ligation in das neue Plasmid (*cut and paste*). Falls Bereiche im N- oder C-Terminus eliminiert (Stop-Codon bei den GFP-Konstrukten) oder hinzugefügt (HA-Tag zur immunologischen Detektion; zusätzliche Schnittstellen) werden sollen, werden mittels PCR unter Verwendung von Primern, die die gewünschte Änderung enthalten, die DNA-Fragmente hergestellt und wie bei der Klonierung beschrieben aufgearbeitet und zur Ligation eingesetzt.

Sowohl zur Klonierung als auch zur Subklonierung werden Vektor und Plasmid mit den identischen Restriktionsenzymen geschnitten. Bei der Wahl der Restriktionsstellen wird nach Möglichkeit darauf geachtet, sticky-ends (3'- und 5'-Überhänge) zu erhalten, da dies die anschließende Ligation erleichtert. Im Falle von Blunt ends (keine Überhänge) kann es bei der Ligation leicht zu einer Religation des Vektors oder zu einer falschen Orientierung des *Inserts* im Vektor kommen. Um dies zu vermeiden, müssen die Vektorfragmente vor der Ligation dephosphoryliert werden.

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten (in der Regel ein Insert und ein Plasmid) katalysieren DNA-Ligasen unter ATP-Verbrauch die kovalente Verknüpfung zwischen 5'-Phosphat und 3'-OH-Gruppen der DNA-Fragmente zu einem Strang oder Ring.

Für die oben beschriebenen Klonierungs- und Subklonierungsprodukte wurde standardmäßig die T₄-DNA-Ligase (New England Biolabs) für die Ligationsreaktion verwendet. Hierbei betrug das molare Mengenverhältnis von Vektor: *Insert* etwa 1:3. Folgender Ligationsansatz wurde auf Eis angesetzt, über Nacht im Wasserbad bei 16°C inkubiert und anschließend bis zur Transformation (siehe Abschnitt 2.1.1.1) bei 4°C aufbewahrt:

DNA-Fragmente	8 µl
10 x Ligasepuffer	1 µl
T ₄ -DNA-Ligase	1 µl

Im Anschluss an die Transformation wurden die Plasmid-DNA mit der Minipräparation gewonnen und das *insert* per Restriktionsanalyse nachgewiesen.

Traten bei der Ligation von PCR-Produkten wie oben beschrieben Schwierigkeiten auf (keine Kolonien auf der Platte nach der Transformation bzw. nur Kolonien, die kein *Insert* enthielten), wurden die PCR-Produkte mit 3'-A-Überhängen (*Taq*-Polymerase) mit Hilfe des TA-Klonierungs-Kits (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in den linearisierten dephosphorylierten Vektor (pT-Adv) ligiert (14°C, 4 h oder über Nacht). Nach der Transfektion in kompetente *E.coli*-Zellen konnte über Blau-Weiß-Selektion (die Agarplatte wurde mit 40 µl X-Gal, 20 mg/ml in DMF vorbehandelt) die Trennung in insert-haltige (weiß) und insert-freie (blau) Plasmide erfolgen. Das Insert wurde dann per *cut und paste* in den finalen Vektor subkloniert.

Blunt-end-PCR-Produkte (*Pfu*-Polymerase) wurden mit Hilfe des pCR-Script-Cam(+)-Kits (Stratagene) subkloniert (nach Angaben des Herstellers) und nach der Transformation auf Chloramphenicol-haltigen (Cam) Agarplatten mittels blau-weiß-Selektion selektiert.

In Tabelle 13 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte aufgelistet.

Material und Methoden

Tabelle 13: verwendete Rezeptorkonstrukte; grau unterlegt ist die zusätzlich eingeführte Sequenz.

Konstrukt	Schnittstelle	Plasmid- /Fragment- größe [bp]	Kloniert aus	Verwendung/Kommentare	Kloniert von/bereitgestellt durch
hS1P ₁ in pcDNA3.1(-) Zeo	5' XbaI- 3' HindIII	6550/1228	humane Milz	Transfektion, Positivkontrolle bei der PCR	T. Ullshöfer, Aventis Pharma Frankfurt
hLPA ₁ in pcDNA3.1(+)	5' HindIII- 3' XhoI	6474/1116	Humanem Hirn (cDNA Library)	Transfektion, Positivkontrolle bei der PCR	S. Gratzler, Aventis Pharma Martinsried
hS1P ₃ in pcDNA3.1(-) Zeo	5' HindIII- 3' XbaI	6497/1149	Humane Herz- cDNA	Transfektion, Positivkontrolle bei der PCR	U. Stillger/ A. Niedernberg
hLPA ₂ in pcDNA3.1(+)-Zeo	5' HindIII- 3' XbaI	6509/1161	Humane Testes- cDNA (Clontech)	Positivkontrolle bei der PCR	U. Stillger/ A. Niedernberg
hS1P ₂ in pcDNA3.1(-) neo	5' ClaI- 3' EcoRI	6506/1074	Umkloniert aus p44266GPC- Konstrukt	Transfektion Positivkontrolle bei der PCR	T. Ullshöfer, Aventis Pharma Frankfurt
rS1P ₂ in pcDNA3.1(-) neo	5' XbaI- 3' BamHI	6518/1140	Rattenlung	Transfektion, Positivkontrolle bei der PCR,	T. Ullshöfer, Aventis Pharma Frankfurt
hS1P ₄ in pcDNA3.1(+)-Zeo	5' HindIII- 3' XhoI	6534/1176	Humane Milz (cDNA Library)	Transfektion, Positivkontrolle bei der PCR,	S. Gratzler, Aventis Pharma Martinsried
hLPA ₃ in pcDNA3.1(+)-Zeo	5' BamHI- 3' XbaI	64347/1073	Humane Herz- cDNA	Transfektion Positivkontrolle bei der PCR	U. Stillger/ A. Niedernberg
hS1P ₅ in pcDNA3.1(+)-Zeo	5' HindIII- 3' EcoRI	6597/1210	Genomischer DNA	Transfektion Positivkontrolle bei der PCR,	U. Stillger/ A. Niedernberg
rS1P ₅ in pcDNA3.1(+)-Zeo	5' HindIII- 3' EcoRI	6603/1216	Rattenhirn-cDNA	Transfektion, Positivkontrolle bei der PCR,	A. Niedernberg
hGPR 45 in pcDNA3.1(+)-Zeo	5' HindIII- 3' EcoRI	6509/1122	Genomischer DNA	Transfektion, Positivkontrolle bei der PCR	U. Stillger/ A. Niedernberg
hGPR 63 in pcDNA3.1(+)-Zeo	5' HindIII- 3' EcoRI	6650/1263	Genomischer DNA	Transfektion, Positivkontrolle bei der PCR,	U. Stillger/ A. Niedernberg
hS1P ₅ in pSPT 18	5' BamHI- 3' EcoRI	4002/918	PCR-Stück aus pcDNA-3.1- Konstrukt	Sondenherstellung Northern Blot Vorwärts: 5' GGCCGGGGATCCCTACTGTGGGGCCGCTCCGC 3' Rückwärts: 5' GCCGCGGAATCTCAGTCTGCAGCCGGTTCTGATACC 3'	A. Niedernberg
rS1P ₅ in pSPT 18	5' HindIII- 3' EcoRI	4287/1203	Cut and paste aus pcDNA-3.1- Konstrukt	Sondenherstellung Northern Blot	A. Niedernberg
hGPR63 in pSPT 18	5' HindIII- 3' EcoRI	4317/1263	Cut and paste aus pcDNA-3.1- Konstrukt	Sondenherstellung Northern Blot	A. Niedernberg
hS1P ₅ in peak 8	5' HindIII- 3' NotI	7300/1198	Cut and paste aus pcDNA-3.1- Konstrukt	Herstellung stabiler Zelllinien	U. Stillger/ A. Niedernberg
rS1P ₅ in peak 8	5' HindIII- 3' NotI	7306/1204	Cut and paste aus pcDNA-3.1- Konstrukt	Herstellung stabiler Zelllinien	U. Stillger/ A. Niedernberg
hGPR45 in peak 8	5' HindIII- 3' NotI	7212/1110	Cut and paste aus pcDNA 3.1- Konstrukt	Herstellung stabiler Zelllinien	U. Stillger/ A. Niedernberg
hGPR63 in peak 8	5' HindIII- 3' NotI	7353/1251	Cut and paste aus pcDNA-3.1- Konstrukt	Herstellung stabiler Zelllinien	U. Stillger/ A. Niedernberg
hS1P ₅ mit HA-Tag in pcDNA3.1(+)-Zeo	5' HindIII 3' BstXI	6624/1237	PCR -Stück aus pcDNA-3.1- Konstrukt	Internalisierungsversuche; Vorwärts-Primer: 5'-ggcggcaagcttgcctgacatgacccgactccgactccgagacgggctg-3' Rückwärts-Primer: 5'-cggaggaccgtagcgcgacctcgcg-3'	U. Stillger/ A. Niedernberg

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur immortalisierter Zellen

2.2.1.1 Kultivierung und Passage

Die Kultivierung aller verwendeter Säugerzellen (ATCC) erfolgte im Brutschrank (Heraeus BDD6220) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte. Die verwendeten Zellkulturmedien (siehe Tabelle 14) sowie das PBS wurden bei 4°C gelagert und vor der Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank (Clean Air) durchgeführt, die verwendeten Kultivationsgefäße waren von Nunc. Das Umsetzen und Aussäen der Zellen erfolgte standardmäßig für jede Zellkultur nach folgendem Schema:

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen, danach zum Ablösen der Zellen mit Trypsin (Biochrom) behandelt (der gesamte Zellrasen sollte mit Trypsin bedeckt sein) und falls erforderlich für einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Pipette in der erforderlichen Menge Medium resuspendiert und entweder im gewünschten Verhältnis weiterkultiviert oder in der berechneten Zellzahl ausgesät. Die Zahl der lebenden Zellen wurde mit Hilfe des Casy1-TT-Zellzählers (Schärfe System) bestimmt, der anhand vorher definierter Bezugsgrößen lebende und tote Zellen über ihr Volumen unterscheidet.

Tabelle 14: Zellkultur-Medien

<u>HEK-Zellmedium</u>		<u>HEK293(PSC)-Zellmedium</u>	
DMEM mit Glutamax (GibcoBRL)	500 ml	DMEM mit Glutamax (GibcoBRL)	500 ml
1 M HEPES pH 7,0 (GibcoBRL)	12,5 ml	1 M HEPES pH 7,0 (GibcoBRL)	12,5 ml
Fetales Kälber-Serum (PAA)	50 ml	Fetales Kälber-Serum (PAA)	50 ml
Penicillin/Streptomycin (Sigma)	5 ml	Penicillin/Streptomycin (Sigma)	5 ml
		G418 Lösung (PAA)	5 ml
Sterilfiltrieren (0,2 µM), Lagerung 4°C		Sterilfiltrieren (0,2 µM), Lagerung 4°C	
<u>CHO-Zellmedium</u>		<u>Medium für stabile Zelllinie (HEK293)</u>	
Basales Iscove-Medium (Biochrom)	500 ml	DMEM mit Glutamax (GibcoBRL)	500 ml
L-Glutamin (0,2 M) (GibcoBRL)	5 ml	1 M HEPES pH 7,0 (GibcoBRL)	12,5 ml
Fetales Kälber-Serum (PAA)	50 ml	Fetales Kälber-Serum (PAA)	50 ml
Penicillin/Streptomycin (Sigma)	5 ml	Penicillin/Streptomycin (Sigma)	5 ml
Gentamicin (GibcoBRL)	0,5 ml	Puromycin (Edge Biosystems)	567 µl
Sterilfiltrieren (0,2 µM), Lagerung 4°C		Sterilfiltrieren (0,2 µM), Lagerung 4°C	

2.2.1.2 **Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Zellkulturen werden bei längerfristiger Lagerung unter flüssigem Stickstoff in einem DMSO-haltigen Medium gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen in den Cryoröhrchen schnell im Wasserbad bei 37°C erwärmt und, sobald sie komplett aufgetaut waren, unter sterilen Bedingungen in frisches, auf 37°C und 5% CO₂ äquilibriertes Medium überführt. Nach 9-10 h wurde das Medium vorsichtig gewechselt, um das DMSO zu entfernen. Danach erfolgt die Kultivierung wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

Zum Einfrieren wurde eine subkonfluente Monolayerzellkultur 2 x mit PBS gewaschen, mit 2 ml Medium/75-cm²-Flasche zum Einfrieren (siehe *Tabelle 15*) versetzt und für ca. 1 Minute inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen abgelöst, im Medium resuspendiert und in 1-ml-Aliquoten in Cryoröhrchen (Nunc) überführt. In einem mit Isopropanol gefüllten Cryocontainer (Nalgene) wurden die Zellen langsam (1°C/Minute) im –80°C-Eisschrank auf -80°C abgekühlt und am nächsten Tag in den Stickstoff-Container (APEGE 110, Air Liquide) überführt.

Tabelle 15: Medium zum Einfrieren von Zellen

Medium zum Einfrieren der Zellen	
FCS	90%
DMSO	10%

2.2.2 Transfektion von Säugerzellen

2.2.2.1 **Transiente Transfektion**

Bei der transienten Transfektion werden mit Hilfe von Liposomformulierungen, die mit den Plasmiden aufgrund ihrer positiven Ladung einen Komplex bilden, die Plasmide in das Zellinnere gebracht, wo für eine begrenzte Zeit (ca. 36 – 58 h) das durch das Plasmid codierte Protein exprimiert wird. Danach entledigt sich die Zelle des artfremden Plasmids und es kommt zu keiner weiteren Proteinproduktion.

HEK293- oder CHO-K1-Zellen wurden, wie in *Tabelle 16* aufgelistet, in geeignete Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht kultiviert. HEK293-Zellen wurden bei ca. 40-50% Konfluenz mit dem Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Roche) nach Angaben des Herstellers transfiziert und über Nacht (18-24 h) mit dem Transfektionsgemisch inkubiert. CHO-K1-Zellen werden bei ca. 60% Konfluenz mit LipofectAMINE (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert und für 12-16 h mit dem Transfektionsgemisch inkubiert. Die eingesetzten DNA- und Transfektionreagenzmengen sowie die Endvolumina sind in *Tabelle 16* aufgelistet.

Tabelle 16: **Transfektion von HEK293- und CHO-K1-Zellen**

Oberfläche	Ausgesäte Zellzahl	DNA : Transfektionsreagenz	Mediumvolumina
80 cm ² (T80)	HEK293: 2,5 x 10 ⁶	8-16 µg/42 µl FuGENE	10 ml HEK-Medium
	CHO-K1: 1,2 x 10 ⁶	8-16 µg/96 µl LipofectAMINE	8 ml OptiMEM
25 cm ² (T25)	HEK293: 7,5 x 10 ⁵	3-6 µg/18 µl FuGENE	6 ml HEK-Medium
	CHO-K1: 4 x 10 ⁵	3-6 µg/36 µl LipofectAMINE	3 ml OptiMEM
9,4 cm ² (6-well)	HEK293: 3 x 10 ⁵	1-2 µg/ 6 µl FuGENE	2 ml HEK-Medium
	CHO-K1: 1,2 x 10 ⁵	1-2 µg/12 µl LipofectAMINE	1 ml OptiMEM

Stabile HEK293-Zellen (siehe Abschnitt 2.2.2.2) wurden - um die zusätzliche transiente Expression eines weiteren Proteins zu erreichen - mit Hilfe des LipofectAMINE-Plus-Reagenz (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die Transfektion erfolgte direkt im 96-well-Format. Pro well wurden insgesamt 0,1 µg DNA eingesetzt. Die Inkubationszeit mit dem Transfektionsreagenz (70 µl) betrug 4 h, danach wurden 130 µl des jeweils angegebenen Mediums (mit 10% FCS oder 10% csFCS) hinzugefügt und die Zellen über Nacht im Brutschrank kultiviert.

2.2.2.2 **Transfektion zur Herstellung stabiler Zelllinien**

Stabile Zelllinien integrieren die Plasmid-DNA stabil in das Genom, so dass das Zielprotein dauerhaft exprimiert wird. Um eine stabile, homogene Zellpopulation zu erhalten, wird ein selektierbares Markergen (in der Regel ein eukaryotisches Antibiotikumresistenzgen, im Vektor enthalten) zusammen mit dem für das Protein kodierende Gen in die Zelle transfiziert. Die anschließende Selektion der stabilen Klone erfolgt durch Zugabe des Selektionsantibiotikums.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Herstellung der stabilen Zelllinien der peak8-Vektor (Edge Biosystems) verwendet, welcher eine Puromycinresistenz aufweist. Durch Transfektion der peak8-Rezeptorkonstrukte in HEK293(PSC)-Zellen konnte mit Hilfe von Puromycin eine Selektion in stabil-exprimierende und nicht-exprimierende Zellpopulationen erfolgen. Auf die Selektion von Einzelklonen wurde verzichtet, es wurden stabile Mischklone hergestellt.

Um die zum Selektionsbeginn erforderliche Antibiotikakonzentration (Puromycin) zu bestimmen, wurde zunächst eine Überlebenskurve für die HEK293(PSC)-Zellen bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Puromycin erstellt. Hierfür wurden HEK293(PSC)-Zellen in 24-well-Platten ausgesät (4×10^4) und am nächsten Tag mit Medium kultiviert, welchem Puromycin in Konzentrationen von 0-1,2 µg/ml zugesetzt wurde. Über 5 Tage wurde die Anzahl an überlebenden Zellen visuell bestimmt (Abbildung 12). Für jede Konzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Konzentration, bei der gerade nicht mehr alle Zellen überlebten (0,4 mg/ml), wurde als Startkonzentration für die Selektion gewählt.

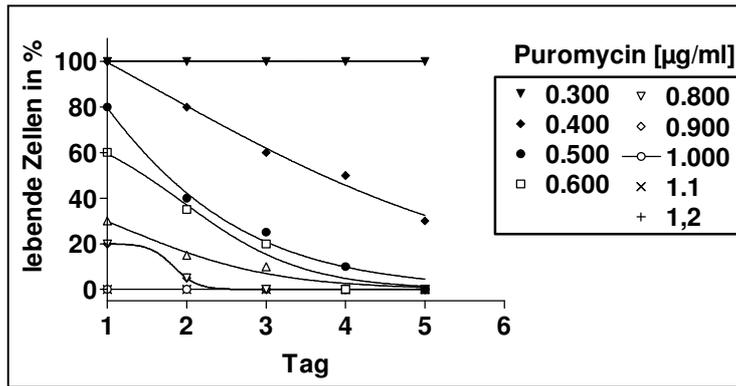


Abbildung 12: **Überlebenskurve für HEK293(PSC)-Zellen bei steigenden Puromycinkonzentrationen.**

HEK293(PSC)-Zellen wurden über fünf Tage mit der angegebenen Menge an Puromycin kultiviert und der prozentuale Anteil an überlebenden Zellen visuell erfasst.

Die peak8-Konstrukte (siehe Tabelle 13) vom hS1P₅-Rezeptor, rS1P₅-Rezeptor, GPR45 und GPR63 sowie der peak8-Vektor alleine wurden in HEK293(PSC)-Zellen wie unter 2.2.2.1 beschrieben in 6-well-Platten transfiziert. 30 h nach der Transfektion wurde dem Medium 0,4 µg/ml Puromycin hinzugefügt, so dass nach ca. fünf Tagen die meisten untransfizierten Zellen abgestorben waren. Durch sukzessives Erhöhen der Puromycinkonzentration auf final 1 µg/ml wurde nach ca. 3 Wochen ein das Plasmid stabil-exprimierender Mischklon erhalten.

2.2.3 Funktionelle Versuche

2.2.3.1 Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mit dem FLIPR®

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FLIPR-Technologie (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices) zur Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) verwendet. Die Zellen werden mit einem Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff (FLUO-4) angefärbt, welcher bei einer GPCR-vermittelten Freisetzung von [Ca²⁺]_i ein quantifizierbares Fluoreszenzsignal hervorruft.

16-20 h nach der transienten Transfektion (siehe Abschnitt 2.2.2.1) wurden CHO-K1- bzw. HEK293-Zellen in *black-wall* 96-well-Platten (Costar- bzw. Poly-D-Lysine-beschichtete *black-wall* 96-well-Platten von Falcon) in einer Zelldichte von 65.000 Zellen (CHO-K1-Zellen) und 75.000 (HEK293-Zellen) pro *well* ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für weitere 18-24 h bei CHO-K1-Zellen in normalem Medium, während bei HEK293-Zellen die Serumkonzentration des Mediums entsprechend den Versuchsbedingungen auf 1% reduziert wurde.

1 h vor der Messung wurden die Zellen mit der für den jeweiligen Zelltyp benötigten Färbelösung (siehe Tabelle 17) angefärbt (95 µl/well) und bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von Probenecid zu Färbelösung, Waschpuffer und Substanzlösungen bei CHO-K1-Zellen verhinderte durch Hemmung eines Anionen-Austausch-Proteins, dass der anionische Farbstoff aus den Zellen wieder herausgepumpt wurde (Poot et al., 1996). Da HEK293-Zellen

diese Pumpe nicht besitzen, war die Zugabe von Probenecid hier nicht erforderlich. Im Anschluss an die Inkubation wurde freier Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit dem jeweiligen Waschpuffer in einem Tecan *cell washer* entfernt und nach dem letzten Waschschrift ein Restvolumen von 100 μl in jedem *well* zurückgelassen.

Zur Herstellung der Substanzplatten wurden die Stammlösungen der Lipide (alle in DMSO gelöst, wenn nicht anders vom Hersteller angegeben) oder des Dopamins im jeweiligen Waschpuffer verdünnt (mindestens 1:500) und als 3 x Lösungen in 96-well-Platten aliquotiert (pro Messung werden 50 μl verwendet). Bei Versuchen mit vermeintlichen allosterischen Modulatoren oder Inhibitoren wurde zunächst eine 96-well-Platte mit 3 x Lösungen dieser Substanzen hergestellt und zusätzlich eine weitere 96-well-Platte mit einer 4 x Lösung S1P oder Dopamin. Die Substanz-Bibliothek-Platten (Biomol) wurden in zwei Schritten in Waschpuffer 1: 333 verdünnt. Mit Ausnahme der Suramin- und NF023-Platten konnten alle Platten bei -80°C gelagert werden.

Der FLIPR wurde so programmiert, dass 50 μl der Agonistplatte in das jeweilige *well* der Zellplatte transferiert wurden und die Freisetzung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anhand der Fluoreszenzveränderungen in einem Zeitraum von 3 min verfolgt werden konnte. In der ersten Minute wurden die Signale in 3-s-Intervallen gemessen, in den letzten 2 min wurden die Intervalle auf 10 s verlängert. Bei der Messung von vermeintlichen allosterischen Modulatoren oder Inhibitoren wurde zunächst eine 3-minütige Messung wie oben beschrieben durchgeführt, evtl. gefolgt von einer weiteren Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C und einer erneuten drei minütigen Messung nach Zugabe der 4 x Lösung von S1P oder Dopamin.

Die FLIPR-Software normalisiert alle initialen Fluoreszenzwerte einer Platte auf ein einheitliches Niveau bei $t = 0$.

Tabelle 17: **Lösungen für die FLIPR-Versuche**

<u>Probenecid-Lösung (10 ml)</u>		<u>Waschpuffer (500 ml)</u>	
Probenecid (Sigma)	713,5 mg	PBS (Gibco BRL)	500 ml
HBSS/25 mM HEPES (GibcoBRL)	5 ml	EGTA (Sigma)	1 mM
NaOH (1 N)	5 ml	MgCl ₂ (Sigma)	1 mM
Lösung immer frisch ansetzen		BSA, fettsäurefrei (Sigma)	0,8%
		Zusätzlich bei CHO-Zellen:	
		Probenecid-Lösung	5 ml
		Mit HCl auf pH 7,4 einstellen	
		(Anm.: Die Zugabe von BSA ist nur bei Messungen von Lipiden erforderlich)	
<u>Färbelösung für CHO-K1-Zellen</u>		<u>Färbelösung für HEK293-Zellen</u>	
HBSS/25 mM HEPES (GibcoBRL)	10, 5 ml	HEK-Medium (1% FCS)	10, 5 ml
FCS (PAA)	105 µl	Pluronsäure (Molecular Probes)	23 µl
Pluronsäure (Molecular Probes)	23 µl	FLUO-4 (in DMSO) (Molecular Probes)	23 µl
FLUO-4 (DMSO) (Molecular Probes)	23 µl	Ansatz für eine 96-well-Platte, frisch ansetzen und lichtgeschützt lagern	
Probenecid- Lösung	105 µl		
Ansatz für eine 96-well-Platte, frisch ansetzen und lichtgeschützt lagern			

2.2.3.2 Bestimmung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration mittels CHOG5A-Zellen

Diese Bestimmung wurde im Labor von Dr. A. Blaukat, Heidelberg, von Herrn Tunaru wie bei Tunaru et al. (in Vorbereitung) beschrieben durchgeführt.

2.2.3.3 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration

Die Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration mit der α -screen-Technologie (Packard Bioscience) beruht auf einer Kompetitions-Reaktion zwischen endogenem cAMP und exogen hinzugefügtem Biotin-cAMP bei der Bindung an ein Anti-cAMP-Akzeptor-*bead*-Konjugat. Die darauffolgende Kopplung an ein Streptavidin-Donor-*bead*-Konjugat erfolgt dann selektiv nur über die biotinylierten cAMP-Moleküle über eine hochaffine Proteininteraktion. Die räumliche Nähe der über das biotinylierte cAMP gekoppelten Donor- und Akzeptor*beads* bewirkt nach Anregung des Donor*beads* bei 680 nm die Freisetzung eines Lumineszenzsignals (520-620 nm) durch den Akzeptor*bead*, welches mit einem Luminometer gemessen werden kann (siehe Abbildung 13). Da es sich hier um eine Kompetitionsreaktion handelt, nimmt die Signalintensität mit steigender endogener cAMP-Konzentration ab.

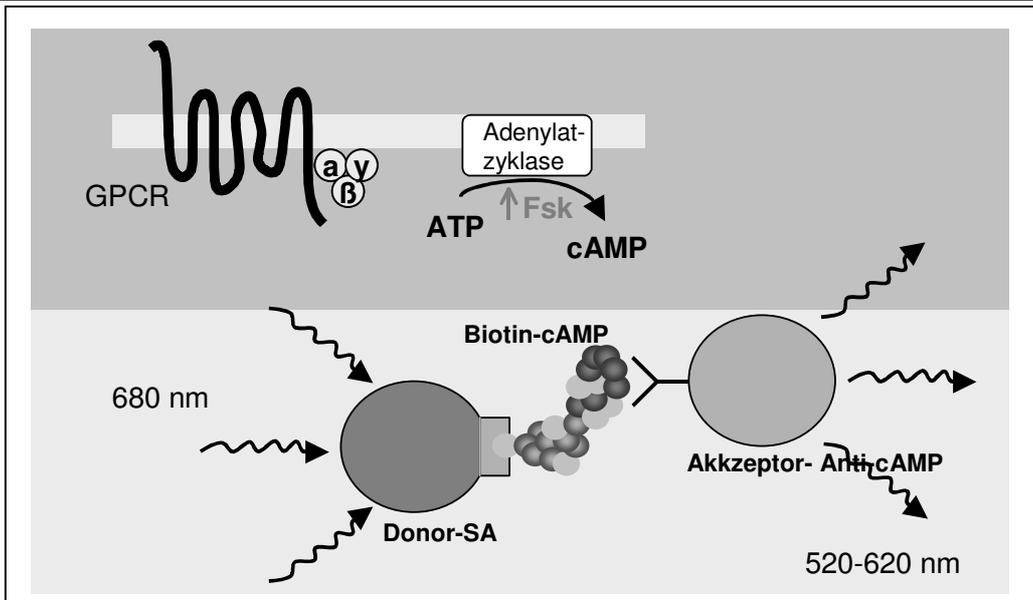


Abbildung 13: **Schematische Darstellung des AlphaScreen-Detection-Kit-Prinzips.** Modifiziert nach Packard Bioscience.

Zur Positivkontrolle sowie zur Anregung der Adenylatzyklase, um eine anschließende Hemmung messen zu können, diente die Stimulation mit Forskolin. Die Versuche wurden mit stabilen Zelllinien durchgeführt. In Vorversuchen wurde die optimale Forskolin-Konzentration, um die GPCR-vermittelte Hemmung der Adenylatzyklase zu messen, mit 1 μM bestimmt. Bei einer zu niedrigen Konzentration wäre das Messfenster zu klein, durch eine zu starke Stimulation durch Forskolin wäre die Hemmung durch den Rezeptor nicht messbar.

Die stabilen Zelllinien (siehe Abschnitt 2.2.2.2) wurden in T25-Flaschen über Nacht in Medium mit 10% FCS oder 10% csFCS kultiviert, am nächsten Tag 1 x mit PBS gewaschen, mit 0,5 ml Versene abgelöst (5-10 min, 37°C), in 4,5 ml serumfreiem HEK-Medium aufgenommen und gründlich resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (Casy1-TT-Zellzähler, siehe auch Abschnitt 2.2.1.1) wurden die Zellen durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in Stimulationspuffer (Tabelle 18; enthält IBMX, um den enzymatischen cAMP-Abbau zu unterbinden) resuspendiert und auf eine Konzentration von 3333 Zellen/ μl eingestellt.

Tabelle 18: **Puffer für die cAMP-Messung**

Stimulationspuffer (50 ml)		Lysispuffer (10 ml)	
HEPES 50 mM (GibcoBRL)	3 ml	HEPES 50 mM (GibcoBRL)	1 ml
BSA (0,11% in H ₂ O) (Sigma)	45 ml	BSA (0,11% in H ₂ O) (Sigma)	9 ml
HBSS 10 x (GibcoBRL)	2 ml	Tween-20 (Bio-Rad)	30 μl
IBMX 50 mM (Sigma)	500 μl		

In einem Eppendorfgefäß wurden die jeweiligen Zellsuspensionen (hS1P₅, rS1P₅, GPR45, GPR63, peak8) nach folgendem Schema in der angegebenen Reihenfolge mit den Reaktionsbestandteilen gemischt (ein Ansatz reichte für eine sechsfach Bestimmung):

	Basal	Basal + Lipide	Stimuliert	Stimuliert + Lipide
Zellsuspension (3333 Zellen/μl)	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl
Anti-cAMP-Acceptor <i>bead</i> (1:50)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
Stimulationspuffer	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl
Forskolin (1μM)	-	-	+	+
Lipide (1μM)	-	+	-	+

Wenn der Versuchsansatz Forskolin oder Lipide enthielt, wurden diese als 2 x Lösung (im Stimulationspuffer) hinzugefügt.

Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und lichtgeschützt bei 25 °C für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden parallel Biotin-cAMP (1:300) und Streptavidin-Donor-*beads* (1:75) in Lysis-Puffer (Tabelle 18) vorinkubiert (alle Bestandteile mischen, vortexen und lichtgeschützt 30 min bei 25°C rotieren lassen). Nach der Inkubation wurden je 75 μl dieses Ansatzes in die Eppendorfröhrchen mit der Zellsuspension gegeben, das Gemisch wurde kräftig gevortext (Einleitung der Zellyse durch Tween 20, sowie durch die Scherkräfte) und erneut einer 90-minütigen Inkubationsphase (schütteln, 25°C, lichtgeschützt) unterzogen (Verlängerung der Inkubation auf bis zu 24 h möglich).

Die Reaktionsansätze wurden anschließend in 6 x 15 μl-Aliquots in eine opaque 384-*well*-Platte (Greiner, 384 small volume) pipettiert (zur Vermeidung von Randeffekten wurden die Randwells nur mit Stimulationspuffer gefüllt), so dass sich eine Zellzahl von 10.000 Zellen/*well* ergab. Die Platte wurde mit einer Folie luftdicht verschlossen und bis zur Messung im Fusion α lichtgeschützt gelagert.

2.2.3.4 [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuche

Bei diesem Versuch wird in Membranpräparationen nach Binden eines Liganden an den Rezeptor der Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) an der α-Untereinheit des G-Proteins gemessen. Hierbei wird anstelle des hydrolysierbaren GTP das nicht hydrolysierbare, radioaktiv markierte [³⁵S]GTPγS verwendet (Wieland und Jakobs 1994). Während bei der herkömmlichen Methode an die α-Untereinheit gebundenes und nicht gebundenes [³⁵S]GTPγS vor der Szintillationsmessung durch Filtration getrennt werden müssen, ist beim hier verwendeten *scintillation proximity assay* (SPA) eine direkte Bestimmung des gebundenen [³⁵S]GTPγS im Versuchsansatz möglich. Das Prinzip beruht auf der Verwendung von mit Weizenkeimagglutinin überzogenen Polyvinyltoluolkügelchen (*beads*), die

einen Szintillator enthalten. Der Rezeptor bindet an diese *beads*. Kommt es nach Aktivierung durch einen Liganden zum $\text{GDP} \rightarrow [^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Austausch an der α -Untereinheit des G-Proteins, welches mit dem Rezeptor verbunden ist, werden die *beads* durch die räumliche Nähe zum radioaktiven $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ zur Photonenproduktion angeregt und senden ein im Szintillationszähler messbares Signal aus. Ungebundenes $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ergibt kein Signal, da die räumliche Nähe zu den *beads* fehlt (Abbildung 14).

Die Zugabe von GDP zum Reaktionsansatz verhindert eine zu hohe basale Austauschrate von $\text{GDP} \rightarrow [^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$, die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgt durch Zugabe eines Überschusses an nicht radioaktivem $\text{GTP}\gamma\text{S}$.

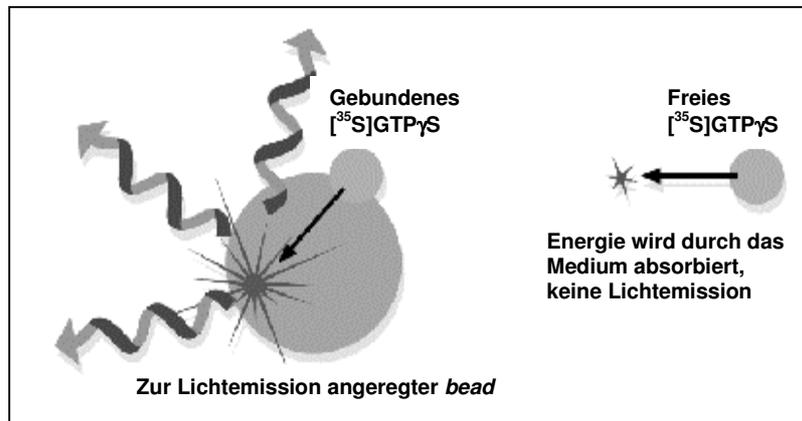


Abbildung 14: **Prinzip des SPA-Versuchs.** Modifiziert nach Amersham Bioscience.

Die rekonstituierten *SPA-beads* (500 mg beads in 5,6 ml 50mM Tris, pH 7,4 mit 0,1% Natriumazid) wurden 1: 2 im Versuchspuffer (Tabelle 19) verdünnt. Die Membranen (siehe Abschnitt 2.3.1) wurden mit Versuchspuffer auf die gewünschte Konzentration/10 μl verdünnt, der Ligand auf 20 x der Endkonzentration.

Danach wurden die Bestandteile nach folgendem Schema in der angegebenen Reihenfolge in weiße, undurchsichtige 96-*well*-Platten (Costar) pipettiert:

	Basal	Stimuliert	Unspezifische Bindung
Versuchspuffer	120 μl	110 μl	100 μl
200 μM GDP	10 μl	10 μl	10 μl
Ligand	0 μl	10 μl	10 μl
200 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$	0 μl	0 μl	10 μl
Membranen	10 μl	10 μl	10 μl
12 nM $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$	10 μl	10 μl	10 μl

Nach einem 15-minütigen Inkubationsschritt unter Schütteln wurden 50 μl der rekonstituierten *SPA-beads* in jedes *well* pipettiert und erneut für 15 min inkubiert. Danach wurde die Platte 5 min lang bei 1000 g zentrifugiert, um die *beads* am Wellboden zu sammeln und damit die

Hintergrundsignale durch ungebundenes [³⁵S]GTPγS zu reduzieren. Die anschließende Messung erfolgte im Packard Top Count.

Tabelle 19: **Puffer für den GTPγS-Versuch**

1 x Versuchs-Puffer	
HEPES (GibcoBRL)	20 mM
NaCl (Sigma)	100 mM
MgCl ₂ (Sigma)	10 mM
EDTA (Sigma)	1 mM
Saponin (Sigma)	100 ng/ml
DTT (Dithiothreitol) (Sigma)	1 mM (1,54 mg/ 10 ml) (frisch hinzufügen)
Proteaseinhibitor Cocktail Set III (100 x) (Calbiochem)	1/100 des Puffervolumens (frisch hinzufügen)

Die Saponinkonzentration wurde im Bereich von 40-250 ng/ml, die GDP-Konzentration von 1 μM bis 20 μM optimiert, bevor das beschriebene Protokoll standardmäßig angewandt wurde.

2.2.3.5 Rho-Aktivierung

Das kleine GTPase-Protein Rho wird in der Signal-Kaskade durch ein Gα_{12/13}-Proteinintermediat – p115RhoGEF - aktiviert und führt seinerseits zu einer Aktivierung der Gentranskription des *c-fos serum response elements* (SRE). Man kann also indirekt die Aktivierung von Rho über die Aktivität des SRE messen.

In diesem Versuchssystem werden die Zellen mit zwei Plasmiden transfiziert: dem firefly- (Glühwürmchen-)Luziferase-Reporter, welcher durch das SRE aktiviert wird, sowie dem Renilla-Luziferase-Reporter, welches durch den Thymidinkinasepromoter (TKR, Thymidinkinase Renilla) aktiviert wird. Das SRE-firefly-Luziferase-Konstrukt ist so mutiert, dass eine Aktivierung durch Serum alleine nicht stattfindet und diese somit ausschließlich auf eine Liganden-induzierte GPCR vermittelte Rho-Aktivierung zurückzuführen ist. Das TK-Renilla-Luziferase-Konstrukt dient als interner Standard, um unterschiedliche Transfektionseffizienzen und Zelldichten sowie Pipettierfehler rechnerisch nachträglich eliminieren zu können. Die Detektion der beiden Luziferasen erfolgt mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System in zwei Schritten: Zunächst wird die Menge an Firefly-Luziferase – und somit die SRE-Menge – quantifiziert. Die Photonenemission wird durch Oxidation von Käfer-Luziferin in Gegenwart von ATP, Mg²⁺ und O₂ erreicht, welche durch die Firefly-Luziferase katalysiert wird und somit als Lichtflash detektierbar ist. Im zweiten Schritt wird gleichzeitig die erste Lumineszenzreaktion gequencht und die der Renilla-Luziferase induziert. Hier wird die katalytische Wirkung der Renilla-Luziferase auf die Umsetzung von Coelenterazin in Gegenwart von O₂ genutzt, um ein detektierbares Lichtsignal zu erhalten.

100.000 HEK293-Zellen, die den zu untersuchenden Rezeptor stabil exprimieren, wurden im normalen Medium in opaque 96-well-Platten mit durchsichtigem Boden (Costar) ausplattiert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen mit SRE- und TKR-Plasmiden mit dem LipofectAMINE-Plus-Reagenz transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.2.1). 24-28 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem jeweiligen Liganden (1 μ M Neurotensin oder 3 μ M S1P) für den angegebenen Zeitraum inkubiert. Am Ende der Inkubationsphase wurden zunächst die SRE-Aktivität und anschließend nach Quenchen des ersten Signals die Aktivität der TKR mit dem *dual luciferase reporter assay system* (Promega) nach Angaben des Herstellers gemessen. Die Lumineszenzbestimmung erfolgte in einem Wallac plate reader (Perkin Elmer). Zur Auswertung wurden die SRE-Messdaten durch die TKR-Messdaten dividiert.

Die SRE- und TKR-Plasmide sowie die stabile Neurotensin-Zelllinie waren eine freundliche Leihgabe des Labors von Bruce Harris, Aventis Pharmaceuticals, Bridgewater.

2.2.3.6 ERK in-vitro-Kinase-Reaktion

Die Phosphorylierung der extrazellulär signal-regulierten Kinasen (ERKs1/2) wurde in CHO-K1-Zellen in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. A. Blaukat, wie bei Blaukat et al. (2000) beschrieben, durchgeführt.

2.2.4 Proliferationsversuche

Zur Bestimmung der proliferativen oder antiproliferativen Effekte eines GPCRs auf die Zelle kann die Anzahl lebender Zellen (visuelle Zählung oder mit Hilfe eines Zellzählers) oder der Einbau radioaktiv-markierter Basen innerhalb eines Zeitraumes gemessen werden.

CHO-K1- oder HEK293- Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und mit dem Rezeptor/pcDNA 3.1(+)-Konstrukt (hS1P₅, rS1P₅ oder GPR63) oder dem Vektor alleine transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Am Tag nach der Transfektion (t = 0) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für weitere 48 h in Medium mit 10% csFCS in An- oder Abwesenheit von 1 μ M S1P kultiviert. Zum Zeitpunkt t = 0 h sowie t = 48 h wurde in jeweils drei bis fünf wells die Zahl lebender Zellen mit Hilfe des Casy1-TT-Zellzählers bestimmt (siehe auch Abschnitt 2.2.1.1).

2.2.5 Morphologische Veränderung bei Zellen

Die morphologischen Veränderungen einer Zelle, die durch die Expression eines Rezeptors mit oder ohne Ligandenzugabe hervorgerufen werden, können mikroskopisch bestimmt werden. Hierbei nutzt man die Tatsache, dass bei der Kotransfektion zweier Plasmide entweder beide oder keines der Plasmide in die Zelle aufgenommen werden: Man transfiziert die gewünschte DNA zusammen mit einem für GFP-kodierenden Plasmid (GFP: Grün

fluoreszierendes Protein) und kann die transfizierten Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar machen.

CHO-K1-Zellen wurden mit dem Rezeptor/pcDNA3.1(+)-Konstrukt (hS1P₅, rS1P₅ GPR45, GPR63 oder rS1P₂) oder dem Vektor alleine im Verhältnis 4:1 mit dem pEGFP-N₁-Vektor transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Nach der Transfektion wurden die Zellen 32 h lang in Medium mit 10% FCS oder 10% csFCS kultiviert und fluoreszenzmikroskopisch (Nicon Eclipse, TE300) analysiert. Um die Auswirkungen von Pertussis-Toxin auf die morphologischen Veränderungen zu untersuchen, wurde 24 h vor der Analyse Pertussis-Toxin (100 ng/ml; Sigma) zum Medium hinzugefügt.

Die gezeigten Ausschnitte sind repräsentativ für das komplette *well*. Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt.

2.2.6 Internalisierungsversuche

Internalisierungsversuche wurden mit dem hS1P₅-HATag/pcDNA3.1-Konstrukt von Herrn PD Dr. Schöneberg, FU Berlin durchgeführt.

2.2.7 Apoptosebestimmung

2.2.7.1 DAPI-Färbung

4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) bildet fluoreszierende Komplexe mit doppelsträngiger DNA. Das Fluorophor hat sein Absorptionsmaximum bei 358 nm, sein Emissionsmaximum bei 461 nm und wird im Fluoreszenzmikroskop mit blauer Farbe sichtbar. (Jagielski M. et al., 1976). Da DAPI bei intakten Zellen nicht in den Zellkern vordringen kann, wird hier keine Blaufärbung beobachtet. Erst die fragmentierte DNA der apoptotischen, permeablen Zellen kann mit Hilfe der DAPI-Färbung sichtbar gemacht werden und erlaubt somit eine Unterscheidung zwischen lebenden und apoptotischen Zellen.

CHO-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben transfiziert und kultiviert. Vor der mikroskopischen Analyse wurden in jedes 6-well ein Tropfen (ca. 5 µl) der DAPI-Stammlösung (2 mg/ml in H₂O) pipettiert und sofort mikroskopisch analysiert. Die gezeigten Ausschnitte sind repräsentativ für das komplette *well*.

2.2.7.2 Caspasemessung

Der zur Messung der Caspaseaktivität verwendete Kit (*fluorimetric-Homogenous-Caspases-Assay-Kit*, Roche) nutzt die Enzymeigenschaften der Caspasen. Während der Zelllyse wird ein Substrat für die Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9, und 10 hinzugefügt, welches enzymatisch zu Rhodamin 110 (R110) umgesetzt wird. Das Produkt dieser Enzymreaktion - die gebildete Menge ist proportional zur Caspaseaktivität - lässt sich fluorimetrisch bestimmen. Mit Hilfe

einer R110-Eichkurve kann dann die Menge an R110 und somit die Caspaseaktivität berechnet werden.

CHO-K1- oder HEK293-Zellen wurden in 80-cm²-Flaschen mit dem Rezeptor/pcDNA3.1(+)-Konstrukt (hS1P₅, rS1P₅ GPR45, GPR63 oder rS1P₂) oder dem Vektor alleine transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Nach 16 h wurden die Zellen 8 h lang in normalem Medium kultiviert, danach mit einer Zelldichte von 4×10^4 /well in schwarzen 96-well-Platten mit durchsichtigem Boden (Costar für CHO-Zellen, Falcon für HEK-Zellen) ausgesät und für weitere 16 h in Medium mit 10% csFCS kultiviert. Die letzten 6 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen gehalten. Die darauffolgende Behandlung mit 1 μ M S1P, 5 μ M Staurosporin (Apoptoseinduktor, zur Positivkontrolle), serumfreiem Medium oder normalem Wachstumsmedium wurde für 2 h oder 7 h durchgeführt. Staurosporin und S1P wurden in serumfreiem Medium verdünnt. Die Caspaseaktivität wurde mit dem *fluorimetric-Homogeneous-Caspases-Assay-Kit* (Roche) nach Angaben des Herstellers gemessen. Die Fluoreszenzmessung (FluoStar Galaxy, BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg) erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Membranpräparation

Hierbei werden aus Zellkulturen, die das gewünschte Protein stabil exprimieren, durch mechanischen und osmotischen Aufschluss der Zelle, Membranen gewonnen, die für funktionelle Versuche (siehe Abschnitt 2.2.3.4) sowie für Western Blots (siehe Abschnitt 2.3.4) eingesetzt werden können.

HEK293(PSC)-Zellen, die das gewünschte Protein stabil exprimieren, wurden in T175-Flaschen (Oberfläche: 175 cm²) bis 90% Konfluenz kultiviert (je nach Versuchsbedingungen mit oder ohne 100 ng/ml Pertussis-Toxin 18-20 h vor der Membranpräparation), danach 1 x mit PBS (37°C) gewaschen und in 30 ml 4°C kaltem PBS/Complete (1 Tablette auf 50 ml, frisch hinzugefügt) geerntet (das Ablösen der Zellen erfolgte durch starkes Klopfen an die Wände der Zellkulturflasche). Die Suspension wurde anschließend bei 4°C mit 1100 g für 15 min zentrifugiert (Sorvall RT 6000D). Das Zellsediment wurde in 10 ml hypotonem HEPES-Puffer (Tabelle 20) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert, um die Zellen zu blähen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines 15-ml-Pyrex-Homogenisators komplett aufgeschlossen und für 10 min bei 4°C und 500 g zentrifugiert. Der Überstand, der die Membranen enthält, wurde gesammelt und bei 4°C und 48000 g für 20 min zentrifugiert (Avanti J-25, Beckmann). Der Rückstand wurde in HEPES-Aufbewahrungspuffer (Tabelle 20) resuspendiert (330 μ l/T175-Flasche) und aliquotiert bei -80°C gelagert. 20 μ l wurden zur Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 2.3.2) verwendet.

Tabelle 20: **Lösungen für die Membranpräparation**

<u>Hypotoner HEPES-Puffer</u>		<u>HEPES-Aufbewahrungs-Puffer</u>	
HEPES (GibcoBRL)	5 mM	HEPES (pH 7,3) (GibcoBRL)	20 mM
EDTA (Sigma)	1 mM	EDTA (Sigma)	1 mM
Complete(1Tabl./50 ml) (Roche)		NaCl (Sigma)	150 mM
auf 4°C gekühlt verwenden, Complete frisch hinzufügen		Sukrose (Sigma)	10%
		Complete (1Tabl./50 ml) (Roche)	
		auf 4°C gekühlt verwenden, Complete frisch hinzufügen	

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinbestimmung werden standardmäßig drei verschiedene Methoden eingesetzt: Die Methoden nach Lowry (Lowry et al., 1951), nach Bradford (Bradford M., 1976) oder nach Fujita (Fujita et al., 1983). Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf einer Oxidation der Proteine durch ein Oxidationsmittel (z.B. Kupfertartrat nach Lowry), wodurch es zu einer charakteristischen Farbänderung der Lösung kommt. Diese kann dann kolorimetrisch ausgewertet werden. Das hier verwendete Reagenz (*Advanced Protein assay reagent*, Biorad) verbindet die Vorteile der drei oben erwähnten Methoden und ermöglicht somit eine sensitive, stabile Bestimmung der Proteinkonzentration. Der hier beobachtete Farbumschlag ist von grün nach blau.

Das 5 x Reagenz (*Advanced Protein assay reagent*, Biorad) wurde 1:5 mit Millipore-Wasser verdünnt und jeweils 1 ml der 1 x Lösung in Einmalglasküvetten pipettiert. Für jede Küvette wurde zunächst die Grundabsorption bei 590 nm gemessen (Ultraspec 2000, Pharmacia). Nach Zugabe von 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung oder der BSA-Kalibrierlösungen (Konzentrationsbereich von 0,05 – 2 mg/ml) und Mischen mit Hilfe einer Pipette wurde die Absorption erneut gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte nach Abzug der jeweiligen Grundabsorption mit Hilfe der BSA-Kalibriergeraden.

2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Mittels der Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach Hitzedenaturierung im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch Variation der Gelzusammensetzung oder dem Einsatz von Konzentrationsgradienten kann die Auftrennung an die erwartete Bandengröße angepasst werden.

Je 5 µg der Membranpräparationen (siehe Abschnitt 2.3.1) oder 10 ng gereinigtes Protein (Positivkontrolle) wurden mit 2 x Probenpuffer (siehe Tabelle 21) versetzt und bei 96°C für 4 min einer Hitzedenaturierung unterzogen. Die denaturierten Proben sowie 10 µl des Molekulargewichtsmarkers (BenchMark Prestained Protein Ladder, Invitrogen) wurden in

einem 10%-TrisGlycin-Gel (Novex, Invitrogen) bei 150 V für 90 min im Laufpuffer (siehe Tabelle 21) elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE). Die anschließende Analyse der elektrophoretischen Trennung der Proteine erfolgte mittels Western Blot (siehe Abschnitt 2.3.4).

Tabelle 21: **Puffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

Probenpuffer		Laufpuffer	
Tris-HCL (Sigma), pH 6,8	0,125 M	Tris-Base (Sigma)	2,9 g
Glycerin (Merck)	20%	Glycin (Sigma)	14,4 g
SDS (W/V) (Sigma)	4%	SDS (Sigma)	11 g
Bromphenolblau (Sigma)	0,005%	Millipore-Wasser	ad 1 L
DTT (Sigma)	100 mM		

2.3.4 Western Blot

Beim Western Blot werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran mittels Stromfluss transferiert. Nach Inkubation mit einem geeigneten Primärantikörper, der für das nachzuweisende Protein spezifisch sein sollte, und einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper kann ein Chemilumineszenzsignal detektiert werden.

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden (siehe Abschnitt 2.3.3) auf eine Immobilon-P-Membran erfolgte in einer Hoefer-Semiphor-Blotting-Apparatur (Amersham) bei 200 mA für 1 h. Abbildung 15 zeigt den Aufbau der Blottingapparatur. Es wurde besonders darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen zurückbleiben, die einen vollständigen Transfer der Proteine verhindern würden.

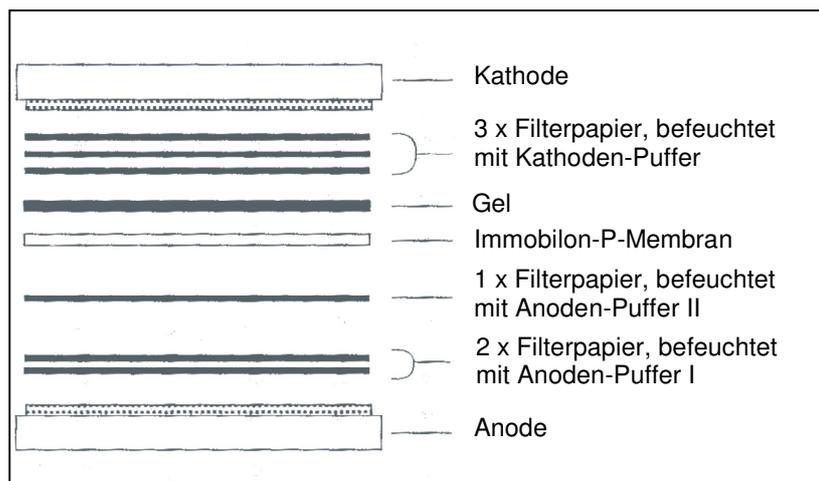


Abbildung 15: **Aufbau einer Western-Blot-Apparatur.** Die einzelnen Lagen werden nacheinander unter Vermeidung von Luftblasen aufeinander geschichtet und anschließend wird der erforderliche Strom für den Transfer der Proteine angelegt (Puffer siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: **Puffer und Lösungen für den Western Blot**

<u>Anoden-Puffer I</u>		<u>Anoden-Puffer II</u>	
Tris (Sigma) pH 10.4	0.3 M	Tris (Sigma) pH 10.4	25 mM
Methanol (Riedel-de-Haën)	10%	Methanol (Riedel-de-Haën)	10%
<u>Kathoden-Puffer</u>		<u>Blockierungslösung</u>	
Tris (Sigma) pH 9.4	25 mM	TBS	1 X
6-Amino-n-Hexansäure (Sigma)	40 mM	Tween (Biorad)	1%
Methanol (Riedel-de-Haën)	10%	Trockenmilchpulver	5%

Im Anschluss an den Transfer wurden die Membranen mit Blockierungslösung für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Inkubation mit der entsprechenden Primärantikörperverdünnung (siehe Tabelle 23) in Blockierungslösung erfolgte alternativ für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Membranen zweimal für je 30 min mit TBS/0,1% Tween gewaschen und danach mit einer 1:10000 Verdünnung des Sekundärantikörpers (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz) in Blockierungslösung erneut für 1 h inkubiert. Im Anschluss an zwei weitere 30-minütige Waschschrte mit TBS/0,1% Tween erfolgte die Detektion mit Hilfe eines geeigneten Detektionsreagenz (ECL von Amersham, Western Lightning Chemiluminescence reagent von NEN, SuperSignal West Femto Maximum von Pierce) und anschließender Entwicklung auf Hyperfilm ECL (Amersham). Die Wahl des Detektionsreagenz sowie der Entwicklungszeit wurden individuell in Abhängigkeit von der Stärke des erwarteten Signals getroffen.

Tabelle 23: **Antikörperverdünnungen für den Western Blot**

Antikörper gegen	Verdünnung	Herkunftstier
Gβ ₁₋₄	1: 500	Hase
Gα _o	1: 500	Hase
Gα _s	1: 500	Hase
Gα _q	1:1000	Hase
Gα ₁₂	1:1000	Hase
Gα ₁₃	1:1000	Hase
Gα _i	1:1000	Hase

2.4 Analytische und bioinformatische Methoden

2.4.1 HPLC-MS-Analyse

Die massenspektroskopische Analyse ausgewählter Lipide zur Überprüfung eventueller Abbau- und Zersetzungsprodukte wurde freundlicherweise im Labor von Herrn Dr. Brönstrup,

Aventis Pharma, durchgeführt. Die Proben wurden in 400 µl Acetonitril/Wasser 50/50 gelöst und dem MS über Flow Injection (10 µl) zugeführt mit einer 50/50 Mischung von (H₂O + 0.1% HCOOH)/(AcN + 0.1% HCOOH) bei einem Fluss von 200 µl min⁻¹. Die Probe wurde über eine Polarity-switch-Funktion abwechselnd mit ESI⁺ und ESI⁻ ionisiert und über einen Quadrupol massenanalysiert. Die Spektren wurden mit einem Waters2790/Micromass-Quattro-Ultima LC/MS-System aufgenommen.

2.4.2 Bioinformatik

Die Datenbankrecherchen nach neuen, zur Familie der Lipidrezeptoren gehörenden Sequenzen wurden von Herrn Dr. Gassenhuber, Aventis Pharma, durchgeführt. Hierbei wurden die öffentlich zugänglichen Datenbanken (EMBL, NCBI) mit einem PSI-BLAST unter Zuhilfenahme der schon bekannten Lipidrezeptor-Sequenzen durchsucht.

2.5 Auswertung, Statistik und graphische Bildbearbeitung

Versuche wurden, solange nicht anders angegeben, in 4-6-facher Bestimmung durchgeführt. Die Bestimmung von Mittelwerten, Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M. für Standard Error of the Mean) erfolgte mit Hilfe der Microsoft-Excel-2000-Software.

Zur Signifikanzprüfung wurde der ungepaarte Student t-Test der Graph-Pad-Prism-3.0-Software verwendet ($p < 0,05$ oder $p < 0,01$). Hierbei symbolisieren in den Abbildungen ein * $p < 0,05$ und zwei ** $p < 0,01$.

Die lineare Regression zur Berechnung der Standardkurven sowie die nicht lineare Regression zur Berechnung von Dosiswirkungskurven wurden mit Hilfe der Graph-Pad-Prism-3.0-Software durchgeführt. Alle Diagramme und Graphen wurden mit Hilfe dieses Programms erstellt.

Die Auswertung der Echtzeit PCR-Daten wurde direkt im LightCycler (Roche Diagnostics) mit der dazugehörigen Software durchgeführt.

Northern Blots wurden mit dem Lumi-Imager und der dazugehörigen Software detektiert, Western Blots wurden auf einem Hyperfilm ECL mit dem Fujifilm-FPM800A-Gerät detektiert und anschließend eingescannt. Ethidiumbromidgele wurden zunächst auf dem Herolab-UVT-2020-UV-Tisch bestrahlt, mit Polaroidfilmen photographiert und eingescannt.

Zellphotos wurden mit der digitalen Kamera des Nikon-Eclipse, TE300-Fluoreszenzmikroskops erstellt und direkt abgespeichert.

Materialien

American Type Culture Collection, USA

CHO-K1-Zellen	Kat.-Nr. CCL-61
HEK293-Zellen	Kat.-Nr. CRL-1573
McA-RH7777	Kat.-Nr. CRL-1601

Amersham Pharmacia biotech, UK

Wheat-germ agglutinin (WGA) coated SPA beads (500mg)	Kat.-Nr. RPNQ 0001
--	--------------------

Biochrom, Berlin

Basales Iscove-Medium	Kat.-Nr. F 0465
Trypsin/EDTA-Lösung	Kat.-Nr. L 2143

Biomol Research Laboratories, USA

Lipid-Substanz-Bibliothek	Kat.-Nr. 2800Q1004
Sphingosin-1-phosphat	Kat.-Nr. SL140
Dihydro-Sphingosin-1-phosphat	Kat.-Nr. SL143
Sphingosin	Kat.-Nr. EI155
Enantio-PAF C16	Kat.-Nr. L110
N,N,-Dimethylsphingosin	Kat.-Nr. SL105
C ₆ -Ceramid	Kat.-Nr. SL110
Lsyo-PAF C16	Kat.-Nr. L101
Arachidonyl-PAF	Kat.-Nr. L102
Lysophosphatidsäure	Kat.-Nr. LP100
Leukotoxin A	Kat.-Nr. LE009
Methoprensäure	Kat.-Nr. GR106
16,16-Dimethyl-Prostaglandin E2	Kat.-Nr. PG021

Bio-Rad, USA

Tween 20	Kat.-Nr. 170-6531
10 x TBS	Kat.-Nr. 170-6435
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Kat.-Nr. 161-0433
Protein-Assay Dye-Reagent-Concentrate	Kat.-Nr. 500-0006

Calbiochem, USA

Proteaseinhibitor Cocktail Set III	Kat.-Nr. 539134
G α_i -Antikörper	Kat.-Nr. 371778

Clontech, USA

Advantage-GC-cDNA-PCR-Kit	Kat.-Nr. K1907-1
Human 12-lane multiple tissue Northern Blot	Kat.-Nr. 7780-1
Human Fetal Heart Quick-Clone cDNA	Kat.-Nr. 7168-1
Human Kidney Quick-Clone cDNA	Kat.-Nr. 7112-1
Human Smooth Muscle Quick-Clone cDNA	Kat.-Nr. 7165-11
pEGFP-N1	Kat.-Nr. 6085-1

Material und Methoden

DIFCO Laboratories, USA

Bacto-Agar	Kat.-Nr. 0140-01
Bacto-Tryptone	Kat.-Nr. 0123-17-3
Bacto-Yeast-Extract, Hefeextrakt	Kat.-Nr. 0127-17-9

Edge Biosystems, USA

Puromycin	Kat.-Nr. 9050022
pEAK 8 Vector

GibcoBRL, USA

Agarose ultra Pure	Kat.-Nr. 15510-027
Dulbecco's MEM mit Glutamax-I	Kat.-Nr. 61965-026
Gentamicin	Kat.-Nr. 15750-037
Hank's Balanced Salt solution (HBSS)	Kat.-Nr. 24020-091
HEPES-Puffer (1M)	Kat.-Nr. 15630-056
L-Glutamin (200mM)	Kat.-Nr. 25030-024
Library Efficiency DH5 α Competent Zellen	Kat.-Nr. 18263-012
Natriumpyruvat	Kat.-Nr. 11360039
Optimem 1	Kat.-Nr. 31985-047
PBS Dulbecco's	Kat.-Nr. 14190-094
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol (25:24:1 v/v)	Kat.-Nr. 15593-031
Trizol-Reagenz	Kat.-Nr. 15596-018
Versene	Kat.-Nr. 15040-033

Invitrogen, USA

BenchMark Prestained Protein Ladder	Kat.-Nr. 10748-010
Gene Pool cDNA-Humane Aorta	Kat.-Nr. D 8350-01
Gene Pool cDNA-Humanes fötales Herz	Kat.-Nr. D 8864-01
Gene Pool cDNA-Humanes normales Hirn	Kat.-Nr. D 8030-01
Gene Pool cDNA-Human normales Herz, Atrium (links)	Kat.-Nr. D 8325-01
Gene Pool cDNA-Human normales Herz, Ventrikel (links)	Kat.-Nr. D 8375-01
Gene Pool cDNA-Human normales Herz, Ventrikel (rechts)	Kat.-Nr. D 8380-01
Gene Pool cDNA-Human normale Niere	Kat.-Nr. D 9070-01
Gene Pool cDNA-Human normale Leber (rechter Lappen)	Kat.-Nr. D 8390-01
Lipofectamin Plus	Kat.-Nr. 11058-021
Lipofectamin	Kat.-Nr. 18324-020
NovexTris-Glycin-Gel 10%	Kat.-Nr. EC 60755
pcDNA1.1	Nicht mehr käuflich
pcDNA3.1 (+) Zeo	Kat.-Nr. V860-20
TA Cloning Kit	Kat.-Nr. K2030-01
Ultracomp Transformations Kit: MC1061/P3	Kat.-Nr. C663-06

Merck, Darmstadt

Ethanol absolut	Kat.-Nr. 100983
Formaldehyd 37%	Kat.-Nr. 2209
Glycerin	Kat.-Nr. 112011
Kaliumacetat	Kat.-Nr. 104830
Kaliumchlorid (KCl)	Kat.-Nr. 105001
Lichrosolv-Wasser	Kat.-Nr. 115333
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Kat.-Nr. 105883
Natriumacetat	Kat.-Nr. 101539

Molecular Probes, USA

Fluo-4-Farbstoff	Kat.-Nr. F-14202
Pluronsäure	Kat.-Nr. P-3000

NEN Lifescience, USA

[³⁵ S]GTPγ S	Kat.-Nr. NEG030H
--------------------------	------------------

New England Biolabs, Schwalbach

T ₄ -DNA-Ligase und entsprechende Puffer	Kat.-Nr. B0202S
---	-----------------

OriGene, USA

Rat poly A ⁺ RNA Northern Blot-12 major Tissues	Kat.-Nr. Rb-2030
--	------------------

PAA Laboratories, Österreich

Fetales Kälberserum	Kat.-Nr. A 15-649
G 418 Lösung	Kat.-Nr P111-012

Packard Bioscience. USA

Alphascreen cAMP assay Kit	Kat.-Nr. 6760600M
----------------------------	-------------------

PAN Bioscience, Aidenbach

Aktivekohleabsorbiertes fetales Kälberserum	Kat.-Nr. P30-2301
---	-------------------

PE Biosystems, USA

BigDye-Terminator-Ready-Reaction-Kit	Kat.-Nr. 4303153
--------------------------------------	------------------

Perkin Elmer, USA

AmpliTaQGold	Kat.-Nr. N808-0244
--------------	--------------------

Promega, Niederlande

Pfu DNA Polymerase	Kat.-Nr. M774A
Dual Luciferase reporter assay system	Kat.-Nr. E1910

Qiagen, Hilden

DyeEx-Spin-Kit (250)	Kat.-Nr. 63106
QIAfilter-Plasmid-Maxi-Kit (100)	Kat.-Nr. 12165
QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (250)	Kat.-Nr. 27106
QIAquick-Gel-Extraction-Kit (250)	Kat.-Nr. 28706
QIAquick-Nucleotide-Removal-Kit	Kat.-Nr. 28306
Proteinase-K	Kat.-Nr. 19133
Rneasy-Maxi-Kit (12)	Kat.-Nr. 75162
Rneasy-Midi-Kit (50)	Kat.-Nr. 75144
Rneasy-Mini-Kit (250)	Kat.-Nr. 74106
Rnase-Free-Dnase-Set (50)	Kat.-Nr. 79254

Riedel-de-Haën, Leiden

Isopropanol	Kat.-Nr. 24137
Methanol absolut	Kat.-Nr. 34860

Roche Diagnostics, Mannheim

Actin RNA Probe, digoxigeninmarkiert	Kat.-Nr. 1 498 145
Anti-Digoxigenin-AP-Fab-fragments	Kat.-Nr. 1 093 274
CDP-Star	Kat.-Nr. 1 685 627
Complete (EDTA-frei)	Kat.-Nr. 1 873 580
DIG-Easy-Hyb	Kat.-Nr. 1 603 558
DIG-RNA-Labeling-Kit (SP6/T7)	Kat.-Nr. 1 175 025
DIG-Wash-and-Block-Buffer-Set	Kat.-Nr. 1 585 762
DNA Molecular weight Marker XVI	Kat.-Nr. 1 855 638
Fugene 6 Transfektionsreagenz	Kat.-Nr. 1 814 443
Homogeneous Caspase assay, fluorometric	Kat.-Nr. 2 236 869
Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	Kat.-Nr. 3 003 230
Positiv geladene Nylonmembranen	Kat.-Nr. 1 417 240
p(DT) ₁₅ primer	Kat.-Nr. 8 142 70
Reverse Transcriptase, AMV	Kat.-Nr. 1 495 062
Reverse Transkriptase, AMV	Kat.-Nr. 1 495 062
RNA molecular weight marker II digoxigenin labelled	Kat.-Nr. 1 525 537

Santa Cruz, USA

Gβ-Antikörper	Kat.-Nr. Sc-261
Gα _{q11} -Antikörper	Kat.-Nr. Sc-392
Gα ₁₂ -Antikörper	Kat.-Nr. Sc-409
Gα ₁₃ -Antikörper	Kat.-Nr. Sc- 410
Gα _o -Antikörper	Kat.-Nr. Sc-387
Gα _s -Antikörper	Kat.-Nr. Sc-823
Goat anti-rabbit IgG-HRP Antikörper	Kat.-Nr. Sc-2030

Material und Methoden

SIGMA Aldrich, Deisenhofen

20 x SSC Puffer	Kat.-Nr. S-6639
2-Mercaptoethanol	Kat.-Nr. M-1348
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX)	Kat.-Nr. I-5879
3M-Natriumacetat pH 5,2	Kat.-Nr. S-7899
6-Amino-n-Hexansäure	Kat.-Nr. A-7824
Ampicillin	Kat.-Nr. A-9518
Bovines Serum-Albumin, fettsäurefrei	Kat.-Nr. A-6003
Bromphenolblau	Kat.-Nr. B-5525
4, 6-Diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid (DAPI)	Kat.-Nr. D-9542
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Kat.-Nr. D-5520
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Kat.-Nr. D-2650
Dithiothreitol (DTT)	Kat.-Nr. D-5545
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 0.5 M)	Kat.-Nr. E-78889
EGTA (Ethylenglykol-bis(β-Aminoethylether)-teraessigsäure)	Kat.-Nr. E-0396
Formamid	Kat.-Nr. F-9037
Forskolin	Kat.-Nr. F-3917
Glycin	Kat.-Nr. G-8898
Guanosin-5'-diphosphat (GDP)	Kat.-Nr. G-7127
Guanosine-5'-[γ-thio]triphosphat (GTP _γ S)	Kat.-Nr. G-8634
Kanamycin	Kat.-Nr. K-0879
Magnesiumchlorid (wasserfrei)	Kat.-Nr. M-4880
MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Kat.-Nr. M-1245
Natriumazid	Kat.-Nr. S-8032
Natriumchlorid (NaCl)	Kat.-Nr. S-9625
Neurotensin	Kat.-Nr. N-6383
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Kat.-Nr. P-0781
Pertussis-Toxin	Kat.-Nr. P-7208
Probenecid	Kat.-Nr. P-87761
RNA-Probe-Ladepuffer	Kat.-Nr. R-1386
Rnase-ZAP	Kat.-Nr. R-2020
SDS (Laurylsulfat)	Kat.-Nr. L-4390
Staurosporin	Kat.-Nr. S-4400
Sukrose	Kat.-Nr. S-0389
Suramin (1,3,5,-Naphthalentrisulfonsäure)	Kat.-Nr. S-2671
Tetracyclin	Kat.-Nr. T-8032
Tris-Base (TRIZMA)	Kat.-Nr. T-1503
Tris-HCL-Lösung (1M)	Kat.-Nr. T-2663

Stratagene, USA

ProStar First Strand RT-PCR Kit	Kat.-Nr. 200420
---------------------------------	-----------------

TOCRIS, UK

NF023	Kat.-Nr. 1240
-------	---------------

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Abschnitte: Im ersten werden die Ergebnisse zur Identifizierung und Charakterisierung des fünften S1P-Rezeptors - z.T. vergleichend zu den anderen sieben LPA/S1P-Rezeptoren - dargestellt. Der zweite Abschnitt fokussiert auf die Untersuchungen des *orphan*-Rezeptors hGPR63 im Kontext mit dem hGPR45.

3.1 Der S1P₅-Rezeptor und die LPA/S1P-Rezeptor-Familie

3.1.1 Bioinformatische Grundlagen

3.1.1.1 Identifizierung und Klonierung des humanen S1P₅-Rezeptors

Der humane S1P₅-Rezeptor (hS1P₅) wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels PCR aus genomischer DNA kloniert. Grundlage der Klonierung bildete eine mit Hilfe eines bioinformatischen Suchvorganges unter Verwendung der bekannten 18 LPA/S1P-Familienmitglieder verschiedener Spezies identifizierte neue genomische Sequenz, die eine hohe Homologie zum humanen S1P₂-Rezeptor (50,9%) sowie eine 86,6%ige Homologie zum S1P₅-Rezeptor der Ratte (rS1P₅) aufwies. Es handelte sich hierbei um eine 1197 Nukleotide umfassende humane Sequenz. Das PCR-Produkt (Abbildung 16) wurde mehrfach sequenziert und unter der Patentnummer DEAV2000/A024 zum Patent angemeldet.

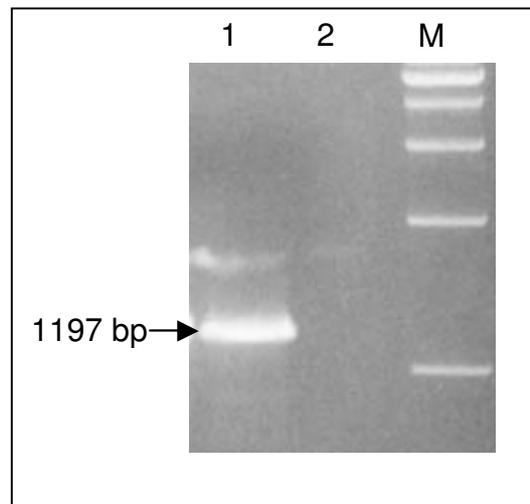


Abbildung 16: **Klonierung des hS1P₅-Rezeptors aus genomischer DNA mittels PCR.**
1: genomische DNA; 2: Negativ-Kontrolle; M: 1-kb-Größenmarker.

Die Nukleotidsequenz des hS1P₅-Rezeptors im Vergleich zu den anderen sieben Familienmitgliedern ist in Abbildung 18 dargestellt. Ein Sequenzvergleich auf Proteinebene der bekannten S1P₅-Homologen findet sich im Anhang A, Seite 149.

Die S1P₅-Rezeptoren aus Ratte, Mensch und Maus wurden parallel zu den Untersuchungen dieser Arbeit veröffentlicht: Der Rattenklon (auch *nrg-1* oder *edg8* genannt) unter der

AccNo. AF115249 (Glickman et al., 1999) bzw. der AccNo. AF233649 (Im et al., 2000), das Maushomologe unter der AccNo. AF327535 (Im et al., 2001) und der humane Rezeptor unter der AccNo. AF317676 (Im et al., 2001).

3.1.1.2 Der orphan-Rezeptor S1P₅ im Familienkontext

Die Mitglieder der Familie der LPA/S1P-Rezeptoren weisen untereinander eine hohe Homologie (40-50%) auf und lassen sich – wie in der Einleitung beschrieben - entsprechend ihres bevorzugten Liganden nochmals in zwei Unterklassen unterteilen: Die LPA-Rezeptoren und die S1P-Rezeptoren.

In der Abbildung 17 und Abbildung 18 zeigt sich eindeutig, dass der hS1P₅-Rezeptor in die Untergruppe der S1P-Rezeptoren gehört. Er weist eine 49,4-, 48,0-, 50,9- und 46,0%ige Identität zu den humanen Rezeptoren S1P₁₋₄ (Berechnungen von Herrn J. Gassenhuber, auf Aminosäurebasis) und eine 33-36%ige Identität zu den Rezeptoren LPA₁₋₃ auf (Im et al., 2001). Die hohe Homologie lässt vermuten, dass S1P auch den Liganden für den hS1P₅-Rezeptor darstellt. Diese Annahme wird zusätzlich durch die hohe Homologie zum rS1P₅-Rezeptor (86,6%) unterstützt, da Malek et al. (2000) zeigen konnten, dass S1P den endogenen Liganden für diesen Rezeptor darstellt.

In Tabelle 24 sind die jeweiligen Accessionnummern der Bac-Klone (bacterial-artificial-chromosome-Klone) und der Rezeptorsequenzen sowie die chromosomale Lokalisation und DNA-Organisation im offenen Leserahmen der humanen Rezeptoren aufgelistet. Letzteres wurde mittels PCR-Analyse mit genomischer DNA als Matrize (Primer wurden so gewählt, dass die Start- und Stop-Codons der Rezeptoren umspannt wurden) untersucht (Daten nur tabellarisch dargestellt). Hierbei fällt besonders die Tatsache ins Auge, dass alle LPA-Rezeptoren in gespleißter Form vorliegen und dass das Intron an der selben Stelle (TM6) im Rezeptor liegt (Untersuchungen von Herrn Gassenhuber), während die S1P-Rezeptoren alle ohne Introns im offenen Leserahmen vorliegen.

Zusätzlich ist die eng begrenzte chromosomale Lokalisation aller LPA/S1P-Rezeptoren zu bemerken. Insbesondere die Tatsache, dass der hS1P₅-Rezeptor auf Chromosom 19 im *Contig* 11424025 zwischen bp 248760 und 249970 in unmittelbarer Nähe des S1P₂-Rezeptors liegt, ist erwähnenswert, da dies auf eine besondere Beziehung dieser Rezeptoren zueinander hinweisen könnte.

Ergebnisse

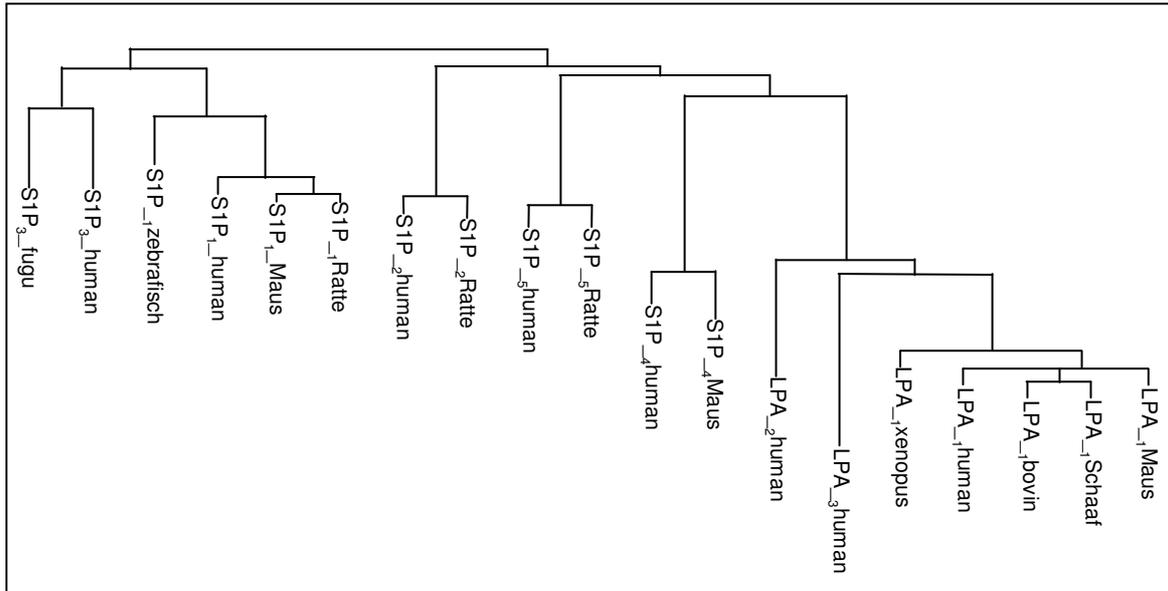


Abbildung 17: **Phylogenetischer Baum der S1P/LPA-Familie**

Tabelle 24: **Die Familie der humanen LPA/S1P Rezeptoren.** Bioinformatische Grundlagen * Der humane S1P₅-Rezeptor wurde gegen Ende dieser Arbeit publiziert.

Humaner Rezeptor	Chromosomale Lokalisation	gespleißt/ ungespleißt im offenen Leserahmen	BAC-Acc.-Nummer	Genbank-Acc.-No	Referenz
S1P ₁ (edg1)	1p21.1-21.3	ungespleißt	AL161741	M31210	Hla et al., 1990
LPA (edg2)	9q31.1-32/18p11.3	gespleißt	AL157881	U80811	An et al., 1997
S1P ₃ (edg3)	9q22.1-q22.2	ungespleißt		X83864	Yamaguchi et al., 1996
LPA ₂ (edg4)	19p12	gespleißt	NT000939	AF011466	An et al., 1998
S1P ₂ (edg5)	19	ungespleißt	AC011511	AF034780	MacLennan et al., 1994
S1P ₄ (edg6)	19p13.3	ungespleißt	AC011547	AJ000479	Graler et al., 1998
LPA ₃ (edg7)	1p22.3-31.2	gespleißt	AL139822	AF127138	Bandoh et al., 1999
S1P ₅ (edg8)	19	ungespleißt	AC011461	AF317676	Im et al., 2001 *

Ergebnisse

	1						60
LPA1_human	MAAISTSI	ISQPQFTAMN	EPQCFYNESI	AFFYNRSGKH	LAT.EWNTVS	KLVMLGL	.GI
LPA3_human	~~~~~	~~~~~MN	E..CHYDKHM	DFFYNRSNTD	TVD.DW.TGT	KLVIVL	CVL
LPA2_human	~~~~~	~~~~~MVI	MGQCYNETI	GFFYNNSGKE	LSS.HWR..P	KDVVVVAL	LGL
S1P1_human	~~~~~MGPTS	VPLVKAHRSS	VSDYVNYDII	VRHYNVTGKL	..NISADKEN	SIKITS	VVFI
S1P2_human	~~~~~	~MATALPPR	LQPVRGNETL	REHYQYVGKL	AGRLKEASEG	S.TITTVL	FL
S1P3_human	~~~~~	~~~~~MGS	YSEYLNPNKV	QEHYNYTKE	..TLETQETT	SRQVSAFIV	
S1P5_human	~~~~~	~~~~~MESGL	LRPAPVSEVI	VLHYNVTGKL	RG.ARYQPGA	GLRA	DAVVCL
S1P4_human	~~~~~MNATG	TPVAPESCQQ	LAAGGHSRLI	VLHYNHSGRL	AGR.GGPS1P	GLGAL	LRGLSV
	61						120
LPA1_human	TVCIFIMLAN	LLVMVAIYVN	RRFHPIIYYL	MANLAAADFF	AGLAYFYLMF	NTGPNTRRLT	
LPA3_human	FFCLFIFFSN	SLVIAAVIKN	RKFHPIIYYL	LANLAAADFF	AGIAYVFLMF	NTGPVSKTLLT	
LPA2_human	TVSVLVLLTN	LLVIAAIASN	RRFHPIIYYL	LGNLAAADLF	AGVAYLFLMF	HTGPR TARLS	
S1P1_human	LICCFIILEN	IFVLLTIWKT	KKFHPIIYYL	IGNLALSDDL	AGVAYTANLL	LSGATTYKLT	
S1P2_human	VICSFIVLEN	LMVLIATWKN	NKFHPIIYYL	IGNLALCDLL	AGIAYKVNIL	MSGKKTFSLS	
S1P3_human	ILCCAIUVEN	LLVLIAVARN	SKFHPIIYYL	LGNLAAADLF	AGVAVFVANTL	ISGSVTLRLT	
S1P5_human	AVCAFIIVLEN	LAVLLVLGRH	PRFHPIIYYL	LGSLTSLDDL	AGAAYAANIL	LSGPTLLKLS	
S1P4_human	AASCLVIVLEN	LLVLAATSH	MRSRHWVYIC	LVNITSLDDL	TGAAYLANVL	LSGARTFRLA	
	121						180
LPA1_human	VSTWLLRQGL	IDTSLTASVA	NLLAIAIERH	ITVFR.MQLH	TRMSNRVVV	VIVVIWMAI	
LPA3_human	VNRWFLRQGL	LDSSLTASLT	NLLVIAVERH	MSIMR.MRVH	SNLTKKRVTL	LILLVWAIAT	
LPA2_human	LEGWFLRQGL	LDTSLTASVA	TLAIAVERH	RSVMA.VQLH	SRLPRGRVVM	LIVGVVWAAL	
S1P1_human	PAQWFLRFGS	MFVALSASVF	SLLAIAIERY	ITMLK.MKLH	NGSNFRFLFL	LISACWVISL	
S1P2_human	PTVWFLRFGS	MFVALGASTC	SLLAIAIERH	LTMIK.MRPY	DANKRHRVFL	LIGMCWLIAF	
S1P3_human	PVQWFLRFGS	ASITLSASVF	SLLAIAIERH	VAIAK.VKLY	GSDKSCRMML	LIGASVWLISL	
S1P5_human	PALWFLRFGG	VFVALTASVL	SLLAIAIERS	LTMAR.RGPA	PVSSRGRTLA	MAAAWGVSL	
S1P4_human	PAQWFLRQGL	LFTALAASTF	SLLFTAGERF	ATMVRPVAES	GATKTSRVYG	FIGLCWLLAA	
	181						240
LPA1_human	VMGAIPTVSGW	NCICDIENCS	NMAPLYSDSY	LVFWAIFNLV	TFVVMVVLYA	HIFGYVRQRT	
LPA3_human	FMGAVPTLGW	NCLCNISACS	SLAPIYSRSY	LVFVTVSNLM	AFLIMVVVYL	RIYVYVKKRT	
LPA2_human	GLGLLPAHSW	HCLCALDRCS	RMAPLLRSY	LAVWALSLL	VFLLMVAVYT	RIFFYVRRRV	
S1P1_human	ILGGLPIMGW	NCISALSSCS	TVLPLYHKHY	ILFCTTVFTL	LLLSIVILYC	RIYSLVTRTS	
S1P2_human	TLGALPILGW	NCLHNLPCDS	TILPLYSKKY	IAFCSIFTA	ILVTIVILYA	RIYFLVKSSS	
S1P3_human	VLGGPLILGW	NCLGHLEACS	TVLPLYAKHY	VLCVVTIFSI	ILLAIVALYV	RIYCVVRSSH	
S1P5_human	LLGLLPPALGW	NCLGRLDACS	TVLPLYAKHY	VLFVCLAFVW	ILAAICALYA	RIYCVVRANA	
S1P4_human	LLGMLPILGW	NCLCAFDRCS	SLLPLYSKKY	ILFCLVIFAG	VLATIMGLYG	AIFRLVQASG	
	241						300
LPA1_human	MRMSRHSSGP	R.....RNR	DTMMSLLKTV	VIVLGAFIIC	WTPGLVLLLL	D.VCCP..QC	
LPA3_human	NVLSPHTSGS	I.....SRR	RTPMKLMKTV	MTVLGAFVVC	WTPGLVLLLL	DGLNCR..QC	
LPA2_human	QRMAEHVSCH	P.....RYR	ETTSLVKTV	VIIIGAFVVC	WTPGQVLLLL	DGLGCE..SC	
S1P1_human	RRLTFR....	.KNISKASRS	SENVALLKTV	IIVLSVFIAC	WAPLFIILLL	DV.GCKVKTC	
S1P2_human	RKVANH....	.NN.....S	ERSMALLRIV	VIVVSVFIAC	WSPLFIILFLI	DV.ACRVQAC	
S1P3_human	ADMA.....A	PQTLALLKTV	TIVLGVFIVC	WLPAFSILLL	DY.ACPVHSC	
S1P5_human	RRLPARPGTA	GTTSTRARRK	PRSLALLRIL	SVVLLAFVAC	WGPLFLLLLL	DV.ACPARTC	
S1P4_human	QKAP.....	...RPAARRK	ARR..LLKTV	LMILLAFIVC	WGPLFGLLLA	DVFGSNLWAQ	
	301						360
LPA1_human	DVLAYERFFL	LLAEFNSAMN	PIIYSYRDKI	MSATFRQILC	QQRSENTPGP	TESSDRSASS	
LPA3_human	GVQHVKHWF	LLALLNSVVN	PIIYSYKDED	MYGTMKMIC	CFSQENP...	ERRPSR	
LPA2_human	NVLAVERYFL	LLAEANSLVN	AAVYSCRDAE	MRRTRFRLLC	CACLRQSTRE	SVHYTSSAQG	
S1P1_human	DILFRAEYFL	VLAVLNSGTN	PIIYTLTNKE	MRRAFIRIMS	CCKCPSGD..S	
S1P2_human	PILFKACWFI	VLAVLNSAMN	PVIYTLASKE	MRRAFFRLV..	.CNC.LVR..G	
S1P3_human	PILYKAHYFF	AVSTLNSLLN	PVIYTWRSRD	LRREVLRLPQ	CWRPGVGV..Q	
S1P5_human	PVLLQADPFL	GLAMANSLLN	PIIYTLNTRD	LRHALLRLVC	CGRHSCGRDP	SGS..QQSAS	
S1P4_human	EYLRGMWIL	ALAVLNSAVN	PIIYSFRSRE	VCAVLSFLC	CGCLRLGMRG	PGDCLARAVE	
	361						418
LPA1_human	LNHTILAGVH	SNDSHVV~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
LPA3_human	IPSTVLSRSD	TGSQYIEDSI	SQGAVCNKST	S~~~~~	~~~~~	~~~~~	
LPA2_human	GASTRIMLPE	NGHPLMTPPF	SYLELQRYAA	SNKSTAPDDL	WVLLAQPNQO	D~~~~~	
S1P1_human	AGKFKRPIIA	GMEFSRSK..	.SDNSSHPQK	DEGDNPETIM	SSGNVNSSS~	~~~~~	
S1P2_human	RGARASPIQP	ALDPSRSKSS	SSNNSHSPK	VKEDLPHTDP	SSCIMDKNAA	LQNGIFCN	
S1P3_human	GRRRVGTPGH	HLLPLRSSSS	LERGMHPTS	PTFLEGNTVV	~~~~~	~~~~~	
S1P5_human	AAEASGLRR	CLPPGLDGSF	SGSERSSPQR	DGLDTSSTGTG	SPGAPTAART	LVSEPAAD	
S1P4_human	AHSGASTTDS	SLRP.RDSFR	GSRSLSFMR	EPLSSISSVR	SI~~~~~	~~~~~	

Abbildung 18: **Sequenzvergleich der acht humanen S1P/LPA-Rezeptoren.** Gezeigt ist die Aminosäuresequenz der Rezeptoren. Die grau unterlegten Sequenzen geben die transmembranären Bereiche der Proteine an. Die Sequenzanalyse wurde mit dem Programm Lasergene durchgeführt.

3.1.2 Expressionsprofile

Die Untersuchungen der Rezeptorexpression in dieser Arbeit wurden mittels Northern Blot sowie mittels PCR mit kommerziell erworbener oder aus RNA hergestellter cDNA durchgeführt. Da viele GPCRs ein sehr geringes Expressionsniveau auf RNA-Ebene besitzen, muss für die Northern-Blot-Analyse entweder mRNA (bis zu 10 µg) oder eine sehr große Menge an Gesamt-RNA (10-20 µg) eingesetzt werden. Daher wurde diese Technik nur zur Charakterisierung der Gewebeverteilung des neuen S1P₅-Rezeptors in verschiedenen Organen angewandt. Alle anderen Expressionsuntersuchungen wurden mittels PCR durchgeführt.

Da die Rezeptoren der LPA/S1P-Familie eine hohe Homologie untereinander aufweisen, wurden bei der Wahl der PCR-Primer mit Hilfe des Sequenzvergleiches Regionen mit niedriger Homologie ausgewählt, um Spezifität der Primer für den jeweiligen Rezeptor zu gewährleisten. Abbildung 19 zeigt exemplarisch die Spezifität der S1P₅-Primer. Nur bei Verwendung des für den hS1P₅-Rezeptor kodierenden Plasmids wurde die erwartete Bande bei 538 bp erhalten (Bande 8). Alle anderen Plasmide der LPA/S1P-Rezeptoren (Banden 1-7) wurden nicht amplifiziert.

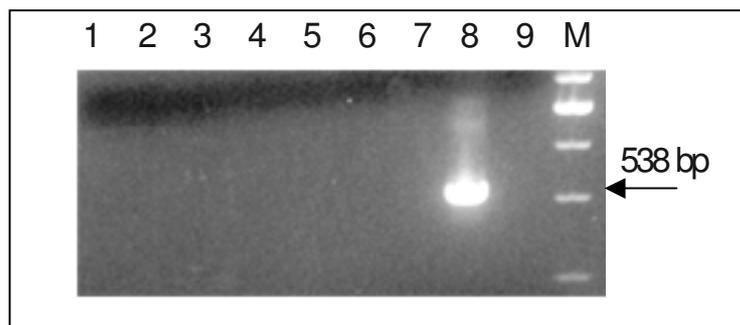


Abbildung 19: **Primerspezifität der hS1P₅-Rezeptor-Primer.** Die Plasmide aller humanen LPA/S1P-Rezeptoren wurden einer PCR mit den hS1P₅-Primern unterzogen. Die erwartete Bande liegt bei 538 bp. 1: S1P₁; 2: LPA₁; 3: S1P₃; 4: LPA₂; 5: S1P₂; 6: S1P₄; 7: LPA₃; 8: S1P₅; 9: neg. Kontrolle; M: 250-bp-Marker.

Die Northern-Blot-Sonden wurden zunächst an ausgewählten Geweben getestet: Die Sonde für den rS1P₅-Rezeptor an Hirn-RNA (Gesamt-RNA sowie mRNA), da Glickman et al. (1999) eine primäre Expression des Rezeptors im Hirn beschrieben haben. Zum Testen der Sonde für den hS1P₅-Rezeptor wurden, da hier noch keine Expressionsdaten in der Literatur vorhanden waren, Nieren- und Herz-RNA (Clontech) gewählt, da diese in der vorgezogenen PCR-Analyse (siehe Abschnitt 3.1.2.1) eine deutliche Expression des hS1P₅-Rezeptors zeigten.

Abbildung 20 A zeigt das Ergebnis der Sonde für den hS1P₅-Rezeptor: Hier wurde eine deutliche Bande in der Niere (A, Bande 1; mRNA 0,5 µg) und im Herz (A, Bande 2; mRNA 0,5 µg) bei 5,5 kb detektiert. Zum Testen der Sonde für das Rattenhomologe wurde Hirn-Gesamt-

RNA (B, Bande 1; 5 µg) und mRNA (B, Bande 2, 1 µg) vergleichend untersucht. Beidesmal traten die zwei Banden bei 2,2 und 3,0 kb auf, jedoch waren die Banden in Gesamt-RNA (B, Bande 1) nur schwach zu erkennen. Hier wird die Detektionsgrenze des Northern Blots bei Verwendung von Gesamt-RNA deutlich.

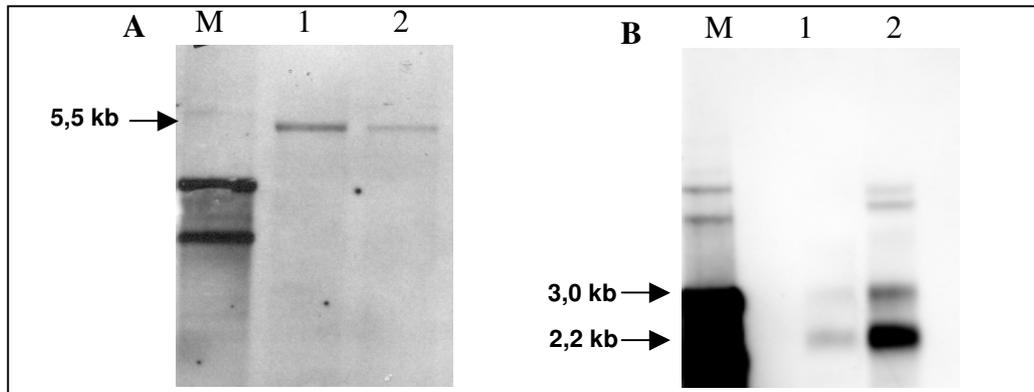


Abbildung 20: **Test der Northern-Blot-Sonden für den hS1P₅-Rezeptor (A) und rS1P₅-Rezeptor (B).**
A: 0,5 µg humane Nieren-mRNA (A1) und Herz-mRNA (A2) wurden mit der Sonde für den hS1P₅-Rezeptor hybridisiert und mit dem Lumiimager ausgewertet. **B:** Ratten-Hirn-RNA (B1; 5 µg) und -mRNA (B2; 1 µg) wurden mit der rS1P₅-Rezeptor-Sonde hybridisiert und im Lumiimager ausgewertet. M: Marker

3.1.2.1 Expression der humanen LPA/S1P-Rezeptoren in Herz-Kreislauf-relevanten Geweben

Die Lipide LPA und S1P sind u.a. für ihre Herz-Kreislaufwirkungen (Fukushima et al., 2001; Tigy 2001) bekannt. Da mehrere Rezeptoren der LPA/S1P-Familie in einigen der Herz-Kreislauf-relevanten Geweben exprimiert sind, wird die Vermittlung der kardiovaskulären Effekte von LPA und S1P unter anderem diesen Rezeptoren zugeschrieben. Um eine eventuelle Zuordnung der Effekte zu einzelnen Rezeptoren durch Ausschließen der nicht exprimierten Rezeptoren vornehmen zu können, wurden alle humanen LPA/S1P-Rezeptoren auf ihre Expression in kardiovaskulären Geweben hin untersucht; diese Analysen im familienübergreifenden Kontext wurden bis dato noch nicht durchgeführt.

In Abbildung 21 sind die Expressionsdaten aller humanen LPA/S1P-Familienmitglieder in Herz, linkem Ventrikel, linkem Atrium, Aorta, Niere, fötalem Herzen und glatter Muskulatur dargestellt: Bis auf den S1P₄-Rezeptor, der ausschließlich schwach exprimiert in der Niere zu finden war (die Bande bei ca. 280 bp im Ventrikel, dem Atrium und der Aorta ist ein unspezifisches Amplifikationsprodukt), sind alle anderen S1P-Rezeptoren ubiquitär in den untersuchten Geweben vorhanden. Der LPA₁-Rezeptor konnte abgesehen von der glatten Muskulatur in allen Geweben nachgewiesen werden. Der LPA₂-Rezeptor weist ein insgesamt niedriges Expressionsniveau auf und war daher wahrscheinlich im Gesamtherzen sowie im fötalen Herzen nicht nachweisbar. Atrium und Ventrikel wiesen eine deutliche, Aorta, Niere und glatte Muskulatur eine schwache Expression des LPA₂-Rezeptors auf. Der LPA₃-Rezeptor war

in allen untersuchten Geweben zu finden. Die Expressionsdaten sind - soweit die entsprechenden Gewebe untersucht wurden - mit den Daten in der Literatur vergleichbar (S1P₁: Hla et al., 1990; LPA₁: An et al., 1996; S1P₃: Yamaguchi et al., 1996; LPA₂: An et al., 1998; S1P₄: Gräler et al., 1998; LPA₃: Bandoh et al., 1999; S1P₁₋₃: Mazaurais et al., 2002). Für den hS1P₅-Rezeptor sind nur Daten eines Dot Blots (Im et al., 2001) vorhanden, die keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die tatsächliche Expression zulassen und somit nicht zum Vergleich dieser Ergebnisse herangezogen werden können.

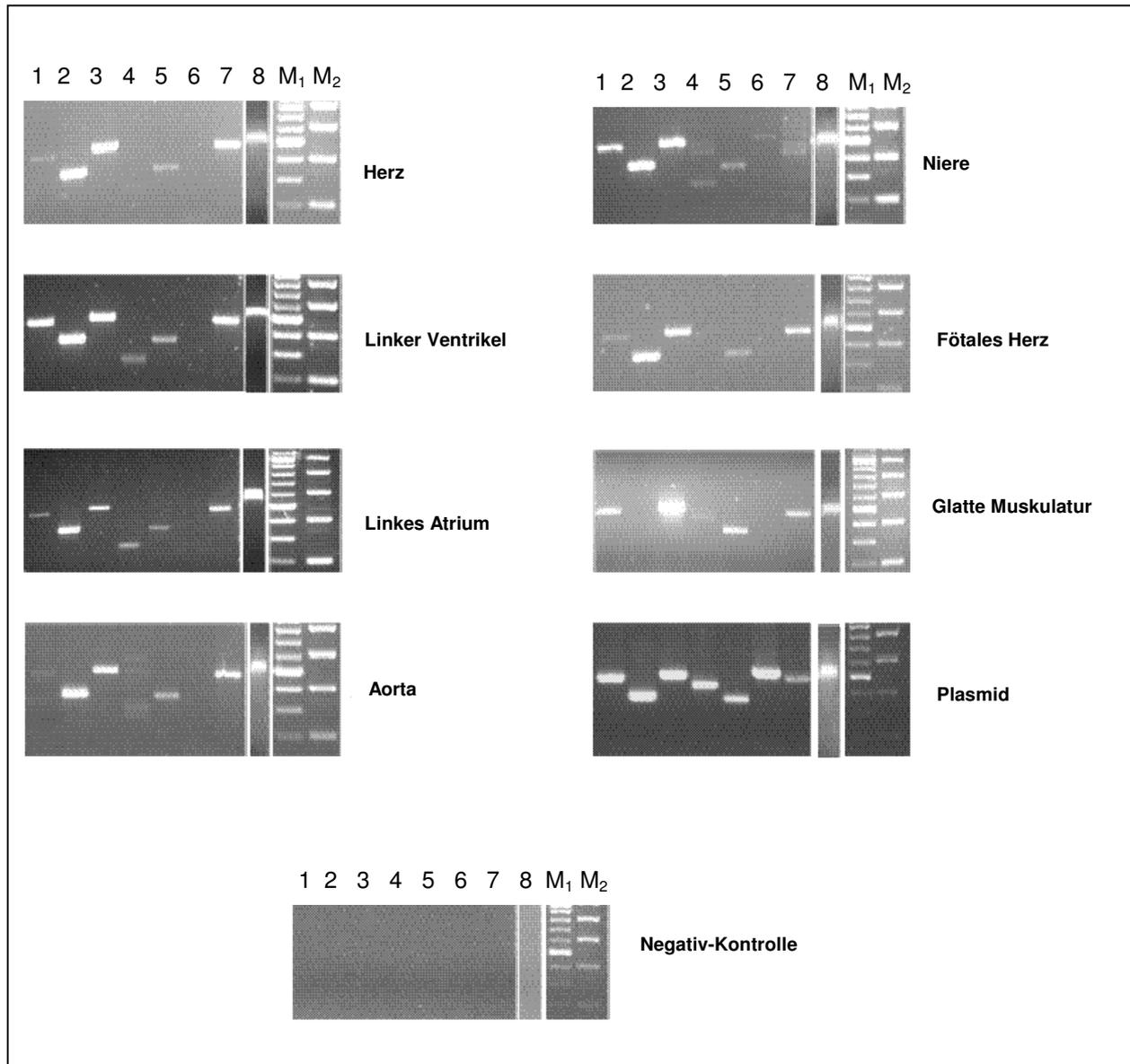


Abbildung 21: **Expressionsanalyse mittels PCR der humanen S1P/LPA-Rezeptoren in Herz-Kreislauf-relevanten Geweben.** 1: S1P₁ (467 bp); 2: LPA₁ (370 bp); 3: S1P₃ (491 bp); 4: LPA₂ (432 bp); 5: S1P₂ (337 bp); 6: S1P₄ (513 bp); 7: LPA₃ (468 bp); 8: S1P₅ (538 bp); M₁: 100-bp-Marker; M₂: 200-bp-Marker. 2 μ l (entspricht 0,5 μ g RNA) der jeweiligen cDNA wurden mit den receptorspezifischen Primern in einer PCR amplifiziert und die Produkte anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Es sei darauf hingewiesen, dass im Laufe der PCR-Untersuchungen deutliche Qualitätsunterschiede in den cDNA-Präparationen unterschiedlicher Herkunft und Hersteller konstatiert worden sind, so dass z.T. beim Einsatz gleicher cDNA-Mengen eines Organes verschiedener Chargen unterschiedliche Ergebnisse erhalten wurden. Dies sowie die Tatsache, dass es sich um eine Endpunkt-PCR handelt, erschwert die quantitative Aussage. Jedoch kann für einen Rezeptor die Expression in verschiedenen Geweben semiquantitativ verglichen werden (z.B. Niere, die Bande des LPA₂-Rezeptors ist hier sehr schwach im Vergleich zu den anderen exprimierenden Geweben).

3.1.2.2 Expressionsprofile der LPA/S1P-Rezeptoren in Endothelzellen und glatten Muskelzellen

Effekte von S1P auf Endothelzellen wie Schutz vor Apoptose in HUVECS (humanen Endothelzellen der Nabelschnur) oder Ausbildung von Zelladhäsionsmolekülen in HAEC (humanen Endothelzellen der Aorta) (Hisano et al., 1999; Rizza et al., 1999) sowie die S1P-Wirkungen auf vaskuläre glatte Muskelzellen (VSCM) wie Migration und Proliferation (Kluk und Hla, 2001; Tamama et al., 2001) legten eine Analyse des Expressionsmusters der LPA/S1P-Rezeptoren in Endothelzellen und glatten Muskelzellen nahe. Einige Untersuchungen wurden auf diesem Gebiet schon durchgeführt, jedoch nie unter Berücksichtigung des hS1P₅-Rezeptors oder der gesamten Familie.

In Abbildung 22 sind die PCR-Ergebnisse dargestellt. Die Rezeptoren hS1P_{2,3,5} sind in allen untersuchten Endothelzellen (HCAEC, humanen Endothelzellen der Koronararterie; HMVEC-L, humanen mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge; HPAEC, humanen Endothelzellen der Pulmonararterie; HUVEC, humanen Endothelzellen der Nabelschnur) und glatten Muskelzellen (HAOSMC, humanen glatten Muskelzellen der Aorta; HCAEMC, humanen glatten Muskelzellen der Koronararterie; HPASMC, humanen glatten Muskelzellen der Pulmonararterie) mehr oder weniger stark exprimiert, während der hS1P₁-Rezeptor in den HAOSMC nicht zu finden ist. Dies stimmt mit einer vor kurzem veröffentlichten Untersuchung von Mazurais et al. (2002) überein, die die Expression des S1P₁-Rezeptors in Endothelzellen jedoch nicht in HAOSMC beschreiben. Der hS1P₄-Rezeptor ist - wie zu erwarten - ebenso wie der hLPA₂-Rezeptor in keiner der Zellarten präsent. Interessanterweise ist der hLPA₁-Rezeptor ausschließlich in glatten Muskelzellen zu finden, nicht aber in Endothelzellen. Der hLPA₃-Rezeptor ist mit zum Teil schwacher Expression in allen untersuchten Zellen mit Ausnahme der HUVECS zu finden. Die schwachen Banden des hS1P₁-Rezeptors können hier nicht direkt mit niedriger Expression in Verbindung gebracht werden, sondern sind durch die Primerwahl - es mussten S1P₁-Rezeptor-spezifische gewählt werden - bedingt.

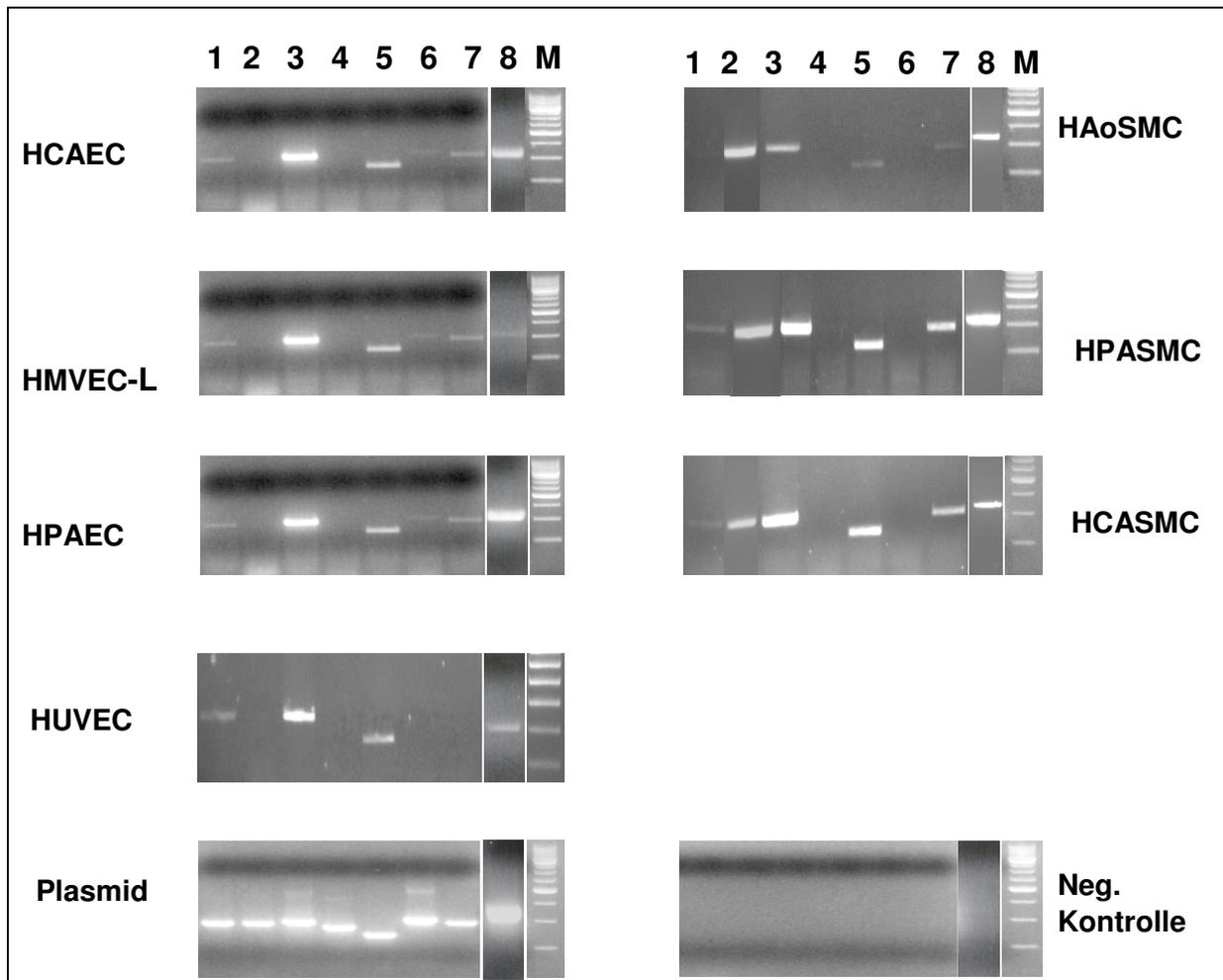


Abbildung 22: **Expressionsanalyse der humanen S1P/LPA-Rezeptoren in verschiedenen Endothel- und glatten Muskel-Zellen mittels PCR.** 1: S1P₁; 2: LPA₁; 3: S1P₃; 4: LPA₂; 5: S1P₂; 6: S1P₄; 7: LPA₃; 8: S1P₅; 9: neg. Kontrolle; M: 250-bp-Marker; HAOSMC, glatte Muskelzellen der Aorta; HCAEC, humane Endothelzellen der Koronararterie; HCAEMC, humane glatte Muskelzellen der Koronararterie; HMVEC-L, humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge; HPASMC, humane glatte Muskelzellen der Pulmonararterie; HPAEC, humane Endothelzellen der Pulmonararterie; HUVEC, humane Endothelzellen der Nabelschnur.

3.1.2.3 Die Gewebeverteilung des humanen und Ratten-S1P₅-Rezeptors

Um die Gewebeverteilung des humanen und Ratten-S1P₅-Rezeptors in kompletten Organsystemen auf RNA-Ebene direkt zu bestimmen, wurde ein Northern Blot durchgeführt. Vom humanen S1P₅-Rezeptor waren zu Beginn dieser Arbeit noch keine Expressionsdaten in der Literatur bekannt, die Analyse des Ratten-S1P₅-Rezeptors wurde zu Vergleichszwecken hinzugefügt.

Abbildung 23 zeigt die Expressionsdaten des humanen (A) und Ratten- (B) S1P₅-Rezeptors in verschiedenen Geweben. Der humane Rezeptor kommt in zwei Splicevarianten vor, wobei die größere Bande bei 5,5 kb in Herz, Skelettmuskel, Niere und Leber zu finden ist, während das kleinere Transkript bei 2,4 kb in Hirn, Milz und den peripheren Blut-Leukozyten vorkommt. Pro

Gewebe ist hier jeweils nur eine Bande vorhanden. Im Gegensatz dazu ist der rS1P₅-Rezeptor fast ausschließlich im Hirn zu finden, in den peripheren Geweben taucht nur eine schwache Bande in der Haut auf. Auch hier kommen zwei Splicevarianten bei 3,0 kb und 2,2 kb vor, die jedoch beide zusammen in den jeweiligen Geweben auftreten. Die von Im et al. (2000) beschriebene Expression in der Milz konnte in unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden. Dies geht allerdings konform mit der Publikation von Glickman et al. (1999), die auch keine Expression in der Milz nachweisen konnten.

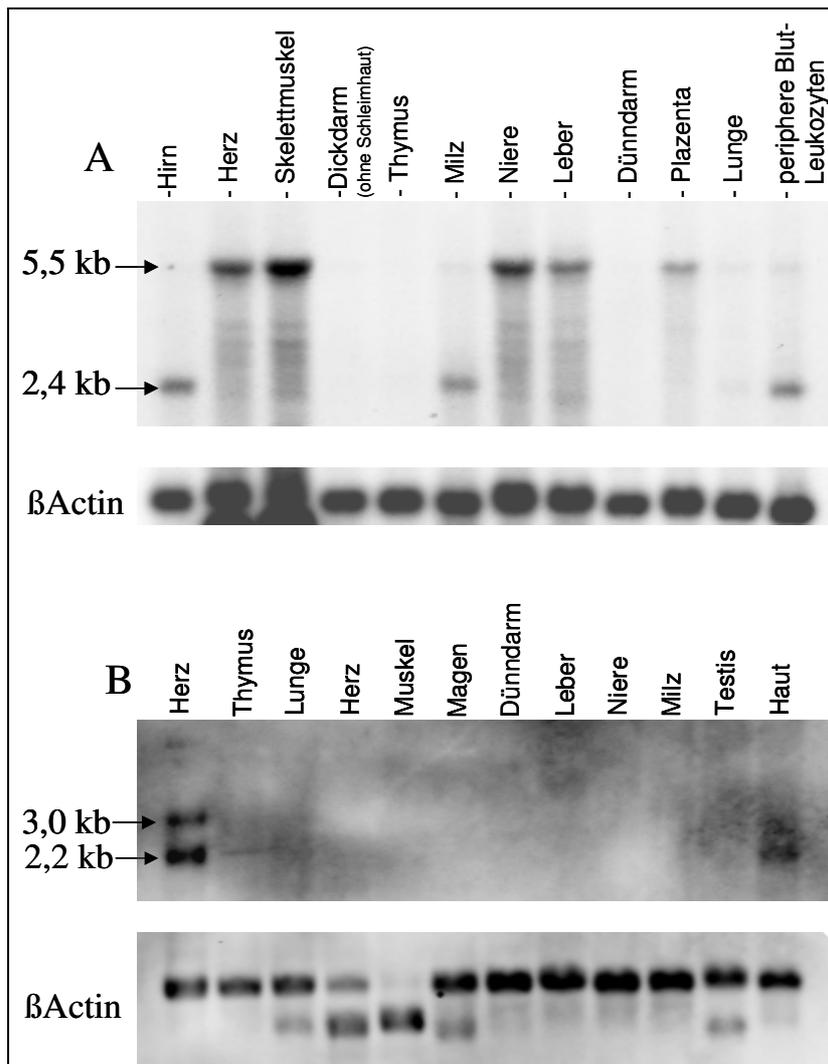


Abbildung 23: **Expressionsprofil des hS1P₅-Rezeptors (A) und des rS1P₅-Rezeptors (B) mittels Northern-Blot-Analyse in verschiedenen Geweben.** Poly(A)⁺-RNA von verschiedenen humanen (1 µg) und Ratten-Geweben (2 µg) wurde auf einer Nylonmembran mit einer DIG-markierten für den humanen S1P₅-Rezeptor (A) oder Ratten-S1P₅-Rezeptor (B) spezifischen Sonde hybridisiert. Jeder Blot wurde zum Entfernen der Sonde gewaschen und auf β-Actin-Expression erneut untersucht. Die Herkunft der jeweiligen RNA ist oberhalb des Blots, die molekulare Masse der detektierten Banden in Kilobasen (kb) ist auf der linken Seite angegeben.

Aufgrund der extrem unterschiedlichen Gewebeverteilung des humanen und Ratten-S1P₅-Rezeptors machte die geplante und methodisch optimierte Expressionsuntersuchung in Herz-Kreislauf-relevanten Tiermodellen mittels LightCycler keinen Sinn. Hier werden in der Regel Ratten als Versuchstiere gewählt, in denen dann in relevanten Geweben kranker Tiere (z.B. Herz und Niere) nach Expressionsunterschieden des Zielmoleküls im Vergleich zu gesunden Tieren gesucht wird. Da diese Gewebe bei der Ratte den S1P₅-Rezeptor nicht exprimieren, kann hier auch nicht auf Regulation untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden daher im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

3.1.3 Agonisten- und Antagonistenidentifizierung

Für den humanen S1P₅-Rezeptor war zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch kein Ligand bekannt. Die in Abschnitt 3.1.1.2 beschriebene hohe Homologie zu den S1P-Rezeptoren sowie zum rS1P₅-Rezeptor legte allerdings die Vermutung nahe, dass S1P auch den Liganden für den hS1P₅-Rezeptor darstellen könnte. Daher wurde mit Hilfe der FLIPR-Technologie untersucht, ob sich der hS1P₅-Rezeptor auch durch S1P anschalten lässt.

CHO-K1-Zellen reagieren weder endogen noch nach Transfektion des rS1P₅ alleine mit Ca²⁺-Freisetzung nach S1P-Stimulation. Daher wurden die Zellen zunächst mit dem S1P-Rezeptor rS1P₅ zusammen mit verschiedenen promiskuitiven G-Proteinen transient transfiziert, um die optimale Rezeptor/G-Protein-Kombination zu bestimmen. Diese künstlichen G-Protein-Chimären verleihen G_α-gekoppelten Rezeptoren die Möglichkeit, an den G_α-Signaltransduktionsweg zu koppeln und somit ein messbares Ca²⁺-Signal nach Ligandenzugabe zu induzieren (Conklin et al., 1993). Hierbei kann es jedoch auch durch zu hohe Promiskuität der G-Proteine zu sehr hohen unspezifischen Hintergrundsignalen kommen. Alle hier verwendeten G-Proteine wurden freundlicherweise von Frau Dr. Kostenis (Aventis Pharma) zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 24 wird deutlich, dass sich durch Kotransfektion des rS1P₅-Rezeptors mit G_α₁₆ (A) bei niedrigen S1P-Konzentrationen noch ein oberhalb des Hintergrundes (= G-Protein alleine) liegendes Signal für die Rezeptor/G-Protein-Kombination ergab. In höheren S1P-Konzentrationen (ab 1000 nM) überwogen jedoch die Hintergrundsignale gegenüber der spezifischen, Rezeptor-vermittelten [Ca²⁺]_i-Aktivierung. Für die Kotransfektion mit G_α_{Δ6qj4myr} (B) war nahezu keine spezifische Aktivierung oberhalb des Hintergrundes zu konstatieren. Als ideal erwies sich die Kotransfektion mit G_α_{qj5} (C), da hier keine messbare [Ca²⁺]_i Freisetzung in Zellen ohne Rezeptortransfektion eintrat und somit keine Hintergrundprobleme die Messung beeinträchtigten. Folglich wurde für die Messungen des hS1P₅-Rezeptors sowie des rS1P₅-Rezeptors die Kombination mit G_α_{qj5} gewählt. Es sei darauf hingewiesen, dass die absoluten Messwerte für die G_α_{qj5}-Kombination beim rS1P₅-Rezeptor mit durchschnittlich 4000-8000 Fluoreszenzeinheiten deutlich unter denen der anderen G-Proteine lagen, das Messfenster allerdings aufgrund des fehlenden Hintergrundsignals am größten war.

Ergebnisse

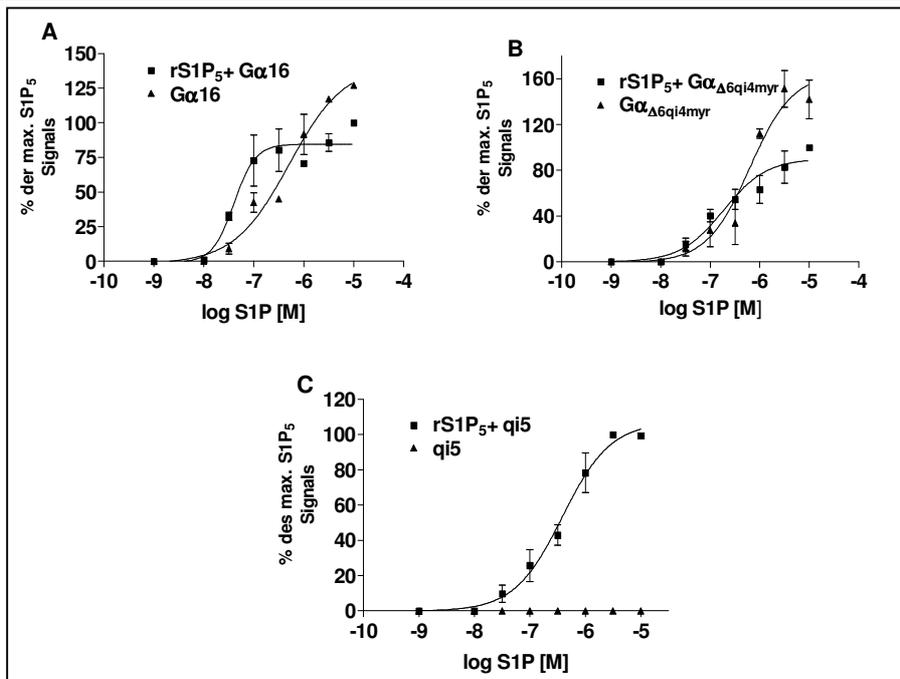


Abbildung 24: **S1P-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung in CHO-K1-Zellen nach Transfektion mit dem rS1P₅-Rezeptor und verschiedenen G-Proteinen.** Eine Dosiswirkungskurve für S1P von 3 nM bis 10000 nM wurde nach transienter Transfektion des G-Proteins alleine oder des rS1P₅-Rezeptors zusammen mit dem jeweiligen G-Protein in CHO-K1-Zellen mit der FLIPR-Technologie aufgenommen. A: $G\alpha_{16}$; B: $G\alpha_{\Delta 6qi4myr}$; C: $G\alpha_{qi5}$. Die Werte wurden auf die maximale Antwort des Rezeptors auf S1P prozentualisiert. $\bar{x} \pm S.E.M.$, $n = 4$

Im Anschluss an die Optimierung der Versuchsbedingungen erfolgte die Untersuchung des hS1P₅-Rezeptors auf S1P und dhS1P als potentiellen Liganden.

Nach transienter Kotransfektion des hS1P₅-Rezeptors und $G\alpha_{qi5}$ in CHO-K1-Zellen und anschließender S1P-Stimulation konnte ein deutliches Fluoreszenzsignal im FLIPR detektiert werden und somit die Ligandenfunktion des S1P am hS1P₅-Rezeptor gezeigt werden. In Abbildung 25 sind die Dosiswirkungskurven für S1P und dhS1P am hS1P₅-Rezeptor und rS1P₅-Rezeptor (zu Vergleichszwecken) im FLIPR-Versuch dargestellt.

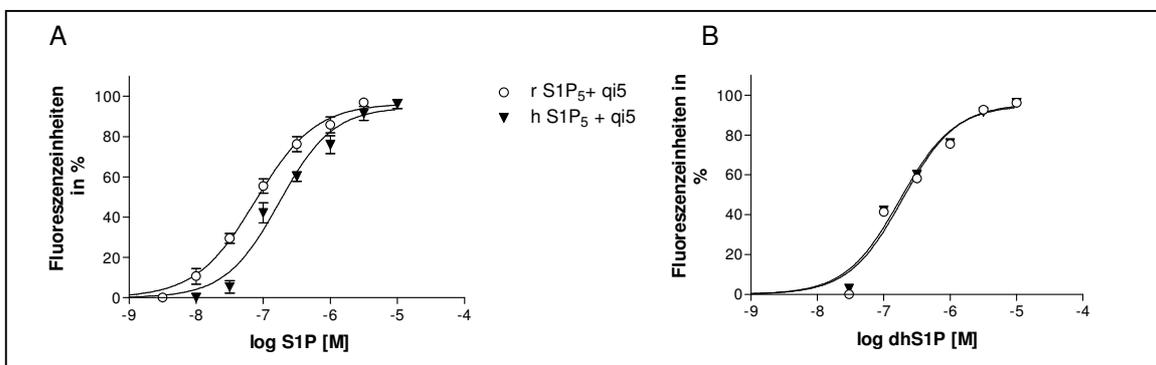


Abbildung 25: **Dosiswirkungskurven für S1P (A) und dhS1P (B) auf $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung, vermittelt durch den hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptor, gemessen mit der FLIPR-Technologie.** Humaner oder rS1P₅-Rezeptor wurden mit $G\alpha_{qi5}$ in CHO-K1-Zellen kotransfiziert, mit steigenden Konzentrationen S1P (A) oder dhS1P (B) stimuliert und anschließend wurde $[Ca^{2+}]_i$ gemessen. $\bar{x} \pm S.E.M.$, $n = 6$

Die EC_{50} -Werte für S1P betragen beim hS1P₅-Rezeptor $1,7 \times 10^{-7}$ M und beim rS1P₅-Rezeptor $7,8 \times 10^{-8}$ M; für dhS1P lagen diese Werte bei $1,8 \times 10^{-7}$ M bzw. $2,1 \times 10^{-7}$ M.

3.1.3.1 Screenen von 201 bioaktiven Lipiden

Da S1P und dhS1P die Liganden für alle S1P-Rezeptoren darstellen (Pyne und Pyne, 2000a; Lynch & Im, 2000), ist nicht klar, welcher Rezeptorsubtyp in einem Zell- oder Organsystem für den intrazellulären Effekt verantwortlich ist. Daher wurde im Folgenden eine Lipid-Substanz-Bibliothek an den einzelnen S1P-Rezeptoren (S1P₁₋₃₊₅) mit der FLIPR-Technologie untersucht, um eventuell neue, spezifische Liganden zu identifizieren. Der S1P₄-Rezeptor wurde ausgeklammert, da dieser Rezeptor keine Herz-Kreislauf Relevanz besitzt. Zusätzlich wurde das Rattenhomologe des hS1P₅-Rezeptors mit in die Untersuchungen aufgenommen, da der Expressionsunterschied in den beiden Spezies (siehe 3.1.2.3) auch eventuell mit Unterschieden in der Ligandenpräferenz einhergehen könnte. Die Substanz-Bibliothek umfasste 201 bioaktive Lipide (eine vollständige Liste der Lipide mit den Endkonzentrationen ist im Anhang C, Seite 152 zu finden) aus den Gruppen der Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene, HETE's (Hydroxyeicosatetraensäuren), DiHETE's (Dihydroxyeicosatetraensäuren), Lipoxine und anderer Eicosanoide, ungesättigten Fettsäuren, Anandamide, Retinoide, Vitamin-D-Metaboliten, PPAR- (proteasome proliferator activated receptor) Liganden, Sphingoide und des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) sowie LPA.

Betrachtet man die Originaldaten bei der S1P-Messung des hS1P₅-Rezeptors in CHO-K1-Zellen, wird deutlich, dass hier die Signale nur eine Intensität zwischen 1500 und 3500 Fluoreszenzeinheiten erreichen und somit deutlich unter denen des rS1P₅-Rezeptors sowie der anderen S1P-Rezeptoren liegen (Daten nicht gezeigt). Damit bestand bei der Messung der Substanz-Bibliothek bei schwach wirksamen Liganden die Gefahr, deren niedriges Signal als unspezifisches Rauschen zu missdeuten. Daher wurde zur Substanz-Bibliotheksmessung des hS1P₅-Rezeptors das Zellsystem gewechselt und in HEK293-Zellen gemessen. Diese setzen aufgrund der endogenen Expression von S1P-Rezeptoren (Meyer zu Heringdorf et al., 2001) endogen $[Ca^{2+}]_i$ nach S1P-Stimulation frei; es kommt also zu höheren Hintergrundsignalen, jedoch sind in diesem Zellsystem die absoluten Messwerte höher. Die Optimierung des eingesetzten G-Proteins erfolgte wie oben beschrieben. Im Anschluss daran wurde zusätzlich die optimale Zellzahl (gutes Hintergrund-zu-Signal-Verhältnis) wie in Abbildung 26 dargestellt mit dem vorher ermittelten G-Protein $G\alpha_{q15}$ ermittelt und mit 60000 festgelegt. Obgleich 40000 Zellen optimal erscheinen, wurde diese Zellzahl aufgrund der hohen Varianzen zwischen den Versuchen nicht ausgewählt (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

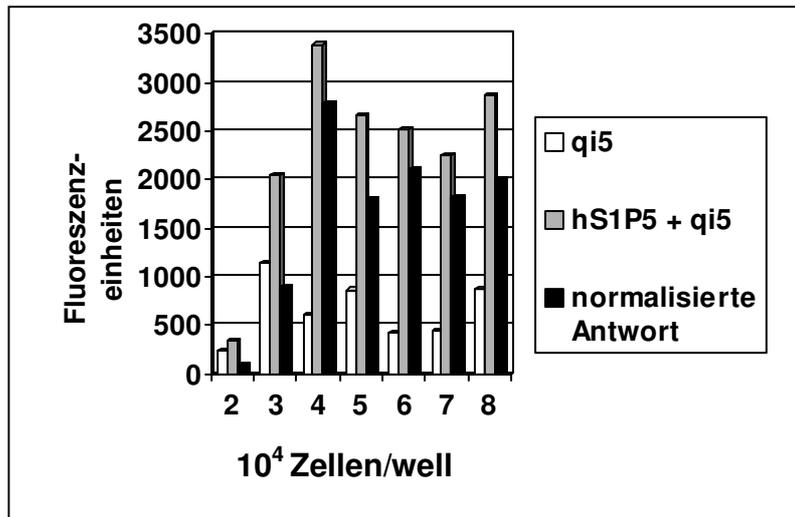


Abbildung 26: **Bestimmung der optimalen Zellzahl bei Messung des hS1P₅-Rezeptors in HEK293-Zellen.**

HEK293-Zellen wurden transient mit dem G-Protein alleine oder mit dem Rezeptor plus G-Protein transfiziert und 20 h vor der Messung in verschiedenen Zelldichten ausgesät. Nach Stimulation mit 1 μ M S1P wurde das Calcium-Signal mit dem FLIPR bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

Alle anderen S1P-Rezeptoren wurden in CHO-K1-Zellen gemessen. Dabei erforderte die Messung des S1P₃-Rezeptors keine G-Protein-Kotransfektion, der S1P₁-Rezeptor, der S1P₂-Rezeptor sowie der S1P₅-Rezeptor wurden zusammen mit $G\alpha_{qi5}$ transfiziert. Die Endkonzentration der Lipide betrug je nach Konzentration der Stammlösung 100 nM oder 1 μ M (1:1000 Verdünnung).

Die Messung der Substanzen der drei Substanz-Bibliothek-Platten ergab für alle humanen S1P-Rezeptoren unabhängig von der verwendeten Zellart das in Abbildung 27 A anhand der Ergebnisse des hS1P₅-Rezeptors exemplarisch gezeigte Bild: Nur S1P (Platte 3 well D8) und dhS1P (Platte 3 well D6) ergaben signifikante Fluoreszenzsignale oberhalb des Hintergrundes (Hintergrundplatten nicht gezeigt). LPA konnte weder in CHO-K1- noch in HEK293-Zellen verlässlich gemessen werden, da beide Zellarten für dieses Lipid eine zu hohe endogene Reaktivität besitzen.

Im Gegensatz zu den humanen Rezeptoren ergab sich beim rS1P₅-Rezeptor bei der Messung der Substanzen der dritten Substanz-Bibliothek-Platte ein anderes - in Abbildung 27 B-D dargestelltes - Bild: Neben S1P und dhS1P ergaben die Lipide C-PAF (1-O-Hexadecyl-2-N-methylcarbonyl-sn-glycero-3-phosphocholin), 2-EPA-PAF (1-O-Hexadecyl-2-O-eicosapantaeoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin), 2-AA-PAF (1-O-Hexadecyl-2-O-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin), Enantio-PAF (1-O-Hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-1-phosphorylcholin), PAF-C18:1 (1-O-Oleoyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin) und Lyso-PAF (1-O-Octadecyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin) in den Rezeptor transfizierten Zellen (Abbildung 27 B) ein Fluoreszenzsignal, welches sich deutlich von dem in nur mit $G\alpha_{qi5}$ transfizierten Zellen (Abbildung 27 C) abhob (Strukturformeln der Lipide siehe Anhang D, Seite 157).

Ergebnisse

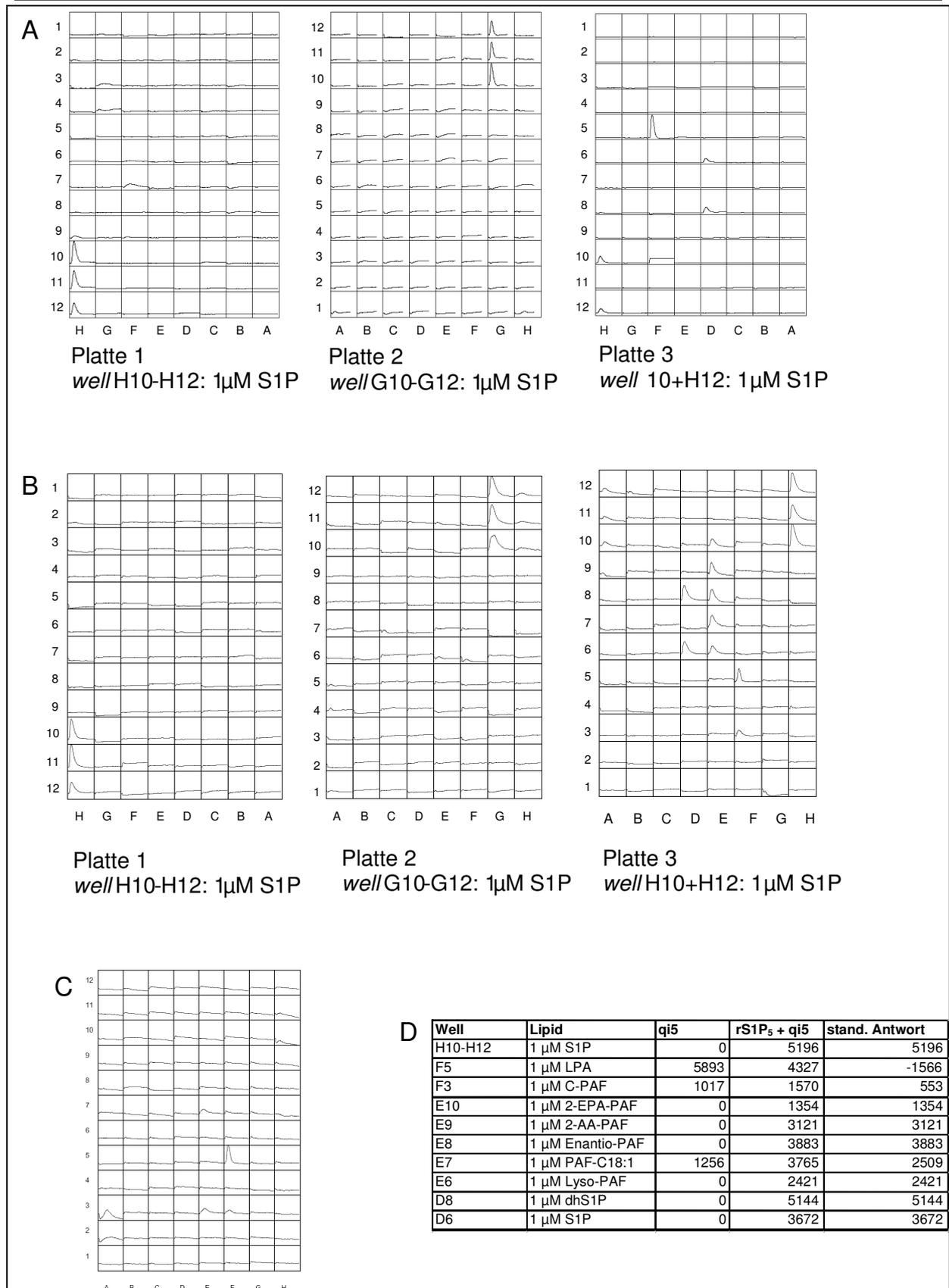


Abbildung 27: **Screenen des hS1P₅-Rezeptors (A) sowie des rS1P₅-Rezeptors (B) mit einer 201 Lipide umfassenden Lipid-Substanz-Bibliothek.** HEK293-Zellen wurden transient mit dem hS1P₅-Rezeptor (A) oder CHO-K1-Zellen mit dem rS1P₅-Rezeptor (B) und G α_{q5} transfiziert. Die [Ca²⁺]_i-Freisetzung wurde nach Stimulation mit den jeweiligen Lipiden der Substanz-Bibliothek

mit der FLIPR-Technologie bestimmt. Gezeigt sind die Originalfluoreszenzwerte. In **C** sind die Hintergrundsignale für Platte 3 in CHO-K1-Zellen dargestellt. **D** gibt einen tabellarischen Überblick über die am $rS1P_5$ identifizierten aktiven Lipide sowie die von diesen Lipiden induzierten Hintergrundsignale und die anschließend standardisierten Antworten. Es ist exemplarisch das Ergebnis einer Messung dargestellt, die repräsentativ für mind. drei Messungen ist.

Erstaunlicherweise konnten die Ergebnisse, die in Mehrfachmessungen mit der Substanz-Bibliothek bestätigt wurden, bei Verwendung der Einzelsubstanzen aus eigenen Stammlösungen nicht reproduziert werden. Bei C-PAF und PAF-C18:1 ergab sich bei den Einzelmessungen - die nun für Rezeptor mit G-Protein und G-Protein alleine parallel auf derselben 96-well-Platte durchgeführt wurden - kein signifikanter Unterschied zwischen $G\alpha_{q15}$ und Rezeptor/ $G\alpha_{q15}$ -transfizierten Zellen mehr. Die restlichen Substanzen waren nicht mehr aktiv. Da es sich bei letzteren in erster Linie um oxidationsempfindliche Stoffe handelt, wurde mittels HPLC-MS-Spektroskopie (Labor Dr. Brönstrup) auf eventuelle Zersetzungsprodukte in den Lösungen der Substanzen der Substanz-Bibliothek sowie in den Stammlösungen der Einzelsubstanzen geprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass insbesondere die eigens hergestellten Lösungen einen sehr hohen Grad an Zersetzungsprodukten aufwiesen. Besonders stark betroffen waren 2-AA-PAF und Enantio-PAF, die aufgrund ihrer ungesättigten Struktur besonders anfällig sind (Spektren siehe im Anhang E, Seite 159). Da diese Zersetzungen durch Licht, Sauerstoff oder geringe Mengen an Schwermetallen katalysiert werden, und im Rahmen dieser Arbeit weder unter Lichtausschluss gearbeitet werden konnte, eine Lagerung der Substanzen unter Inertgas nicht möglich und auch ein vollständiger Ausschluss von Schwermetallionen nicht zu gewährleisten war, wurde auf eine weitere Charakterisierung der Substanzen verzichtet.

3.1.3.2 Allosterische Effekte auf den $hS1P_5$ - und $rS1P_5$ -Rezeptor

Im Folgenden wurden die Lipide der Substanz-Bibliothek auf potentielle allosterische Effekte auf die $S1P$ -induzierte Rezeptoraktivierung getestet. Hierfür wurden CHO-K1-Zellen transient mit dem $rS1P_5$ - und $hS1P_5$ -Rezeptor und $G\alpha_{q15}$ transfiziert, mit den Lipiden 3 min inkubiert, anschließend mit $1 \mu M$ $S1P$ stimuliert und die jeweiligen Calcium-Antworten quantifiziert. Für diese Fragestellung eigneten sich CHO-K1-Zellen auch besser für die Charakterisierung des $hS1P_5$ -Rezeptors, da in diesem Zellsystem die $S1P$ -vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung gut – wenn auch mit niedriger Fluoreszenzintensität - zu messen ist und die in CHO-K1-Zellen fehlenden Hintergrundsignale auf $S1P$ eine Variable - und damit eine Fehlerquelle - weniger bei der Auswertung mit sich bringen.

Abbildung 28 zeigt Effekte einer Auswahl einiger Lipide auf die $S1P$ -vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung am $hS1P_5$ - und $rS1P_5$ -Rezeptor, wobei die mit den prominentesten Effekten sowie einige neutrale Lipide ausgewählt wurden. Inkubation mit 16,16-Dimethyl-Prostaglandin E_2 bewirkte sowohl am $hS1P_5$ -Rezeptor (A) als auch am $rS1P_5$ -Rezeptor (B) eine Erniedrigung

der durch S1P-Stimulation freigesetzten Calciummenge auf 70 bzw. 80%. Im Gegensatz dazu konnte die Methoprensäure bei beiden Rezeptoren eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung induzieren (125% bzw. 130%). Neutral verhielten sich an beiden Rezeptoren DHLA-PAF (1-O-Hexadecyl-2-O-dihomo- γ -linolenoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin) sowie C₂-Dihydroceramid. Die anderen Lipide wiesen unterschiedliche Effekte auf die beiden Rezeptoren auf. Leukotrien B₄ (LTB₄) sowie Leukotoxin A und 8-Epi-PGF_{2 α} hatten keinen Effekt auf den hS1P₅-Rezeptor, während sich beim rS1P₅-Rezeptor eine ca. 15% Erniedrigung des Signals durch LTB₄ - sowie eine ca. 20%ige Erhöhung nach Zugabe von Leukotoxin A oder 8-Epi-PGF_{2 α} - zeigte. 15-S-HEDE (15-(S)-Hydroxyeicosa-11Z,13E-diensäure) sowie 13,14-Dihydro-15-keto-PGF_{2 α} erhöhten im Gegensatz dazu die S1P-vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung am hS1P₅-Rezeptor und zeigten keinen Effekt am rS1P₅-Rezeptor. 12-(R)-HETE (12-(R)-Hydroxyeicosa-5Z,8Z,10E,14Z-tetraensäure) verhielt sich leicht stimulierend auf die S1P-vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung über den rS1P₅-Rezeptor und war ohne Einfluss auf den hS1P₅-Rezeptor.

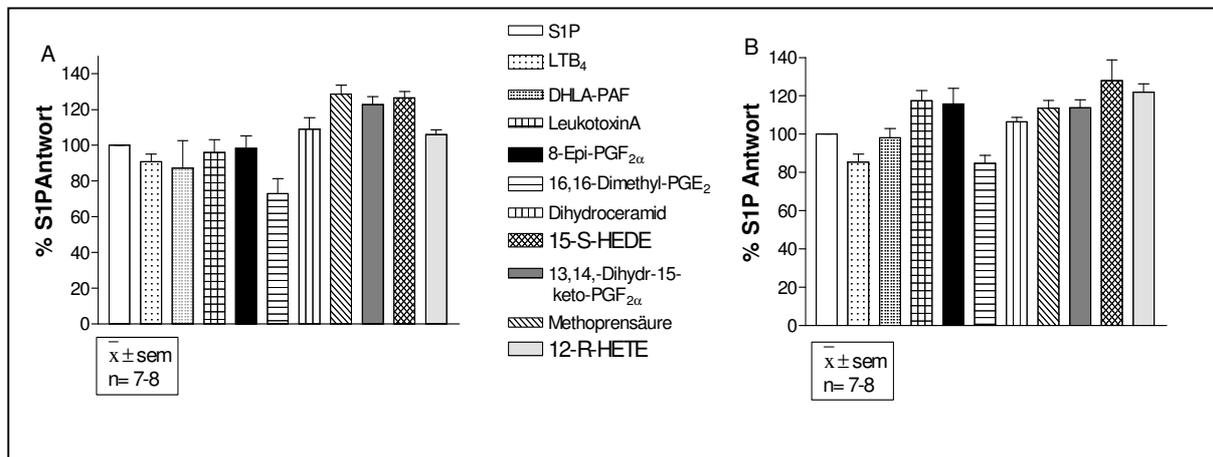


Abbildung 28: **Allosterische Effekte verschiedener Lipide am humanen S1P₅-Rezeptor (A) und Ratten-S1P₅-Rezeptor (B).** CHO-K1-Zellen wurden mit dem entsprechenden Lipid für drei Minuten inkubiert und anschließend mit 1 μ M S1P stimuliert. Die Daten sind als % des S1P-Wertes (die Inkubation erfolgte hier mit Puffer ohne Lipid) dargestellt. $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$; n = 7-8; LTB₄: Leukotrien B₄; DHLA-PAF: 1-O-Hexadecyl-2-O-dihomo- γ -linoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin; 8-Epi-PGF_{2 α} : 8-Epi-Prostaglandin F_{2 α} ; 16,16-Dimethyl-PGE₂: 16,16-Dimethylprostaglandin-E₂; 15-S-HEDE: 15-(S)-Hydroxyeicosa-11Z,13E-diensäure; 13,14,-Dihydro-15-keto-PGF_{2 α} : 13,14,-Dihydro-15-ketoprostaglandin-F_{2 α} ; 12-R-HETE: 12-R-Hydroxyeicosa-5Z,8Z,10E,14Z-tetraensäure.

Die Lipide mit potentieller allosterischer Wirksamkeit wurden daraufhin in drei verschiedenen Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 1000 nM) in der Inkubationsphase eingesetzt. Anschließend wurde eine Dosiswirkungskurve vom S1P im FLIPR aufgenommen. In Abbildung 29 sind exemplarisch drei verschiedene Lipide und deren allosterische Effekte auf die S1P-Dosiswirkungskurve im FLIPR-Versuch dargestellt. In Abbildung 29 A wird der Einfluss von 8-Epi-PGF_{2 α} auf den rS1P₅-Rezeptor gezeigt. Erstaunlicherweise bewirkte die Inkubation mit 10 nM 8-Epi-PGF_{2 α} eine Erhöhung und 100 nM eine Erniedrigung der S1P-vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung, während 1000 nM keinen Effekt zu haben schienen. Den

vorausgegangenem Einpunktuntersuchungen zufolge hätte es jedoch insgesamt zu einer leichten Erhöhung kommen müssen. In Abbildung 29 B – hier sind die Effekte von LTB₄ am rS1P₅-Rezeptor dargestellt - war keine Verschiebung der Dosiswirkungskurven mehr zu beobachten, wenn-gleich hier eine Erniedrigung der [Ca²⁺]_i erwartet worden war. Abbildung 29 C hingegen zeigt die Effekte von 16,16-Dimethyl-PGE₂ am hS1P₅-Rezeptor. Auch wenn es hier nach einer leichten Hemmung durch hohe Konzentrationen (1000 nM) aussieht, konnten jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen keine statistisch signifikanten Aussagen getroffen werden. Zudem näherten sich die Kurven mit zunehmender Häufigkeit der Durchführung stetig aneinander an.

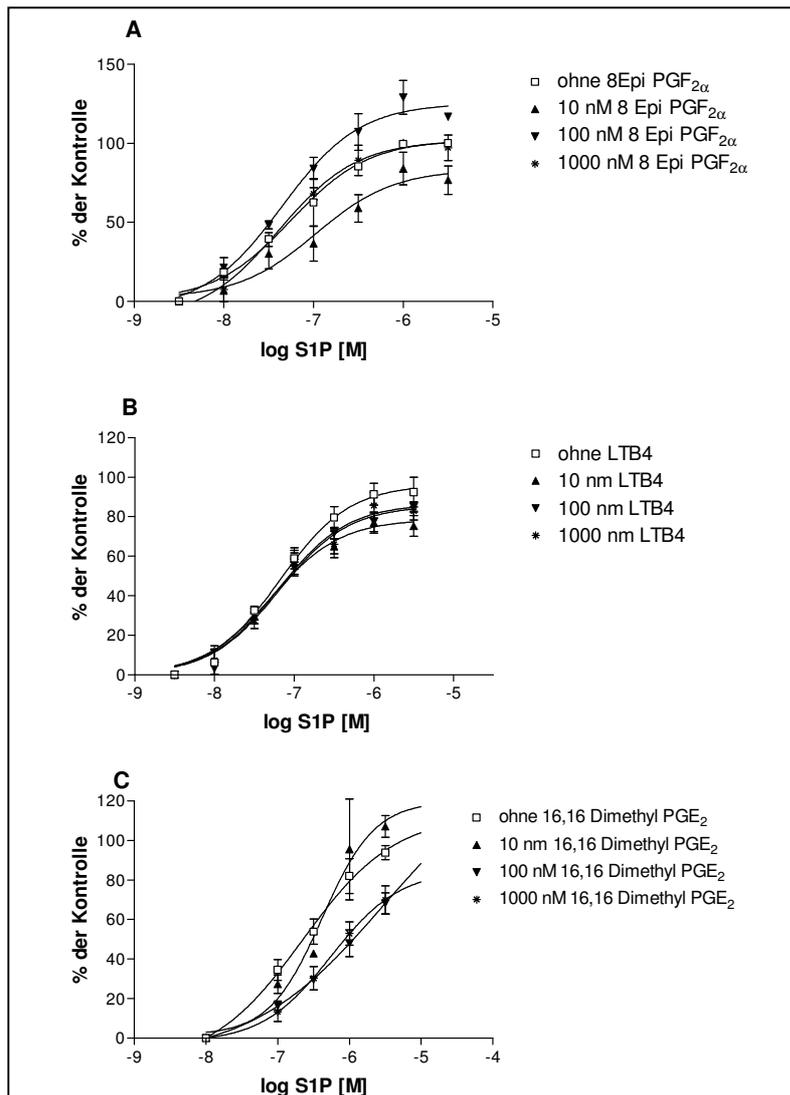


Abbildung 29: **Allosterische Effekte verschiedener Lipide auf die Dosiswirkungskurve der S1P-induzierten [Ca²⁺]_i-Freisetzung.** Mit dem rS1P₅-Rezeptor (A und B) oder hS1P₅-Rezeptor (C) und G α_{q15} transient transfizierte CHO-K1-Zellen wurden mit den entsprechenden Konzentrationen an 8-Epi-PGF_{2 α} (A), LTB₄ (B) oder 16,16-Dimethyl-PGE₂ (C) für 3 Minuten inkubiert, danach mit steigenden Konzentrationen an S1P stimuliert und die S1P-induzierte [Ca²⁺]_i-Freisetzung mit der FLIPR-Technologie gemessen. 100% = Maximalwert ohne Lipid. $\bar{x} \pm S.E.M.$, n = 3

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die FLIPR-Technologie zur Identifizierung von Substanzen, die - wie es bei der Allosterie meist der Fall ist - mit einem sehr kleinen Messfenster einhergehen, nicht geeignet ist, oder der Versuch mindestens in 10 bis 15facher Ausführung durchgeführt werden sollte, um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können. Aus diesem Grund wurden die anderen S1P-Rezeptoren – die Ein-Punktmessungen mit der Substanz-Bibliothek sind auch mit diesen durchgeführt worden - nicht weiter im Hinblick auf allosterische Effekte von Lipiden untersucht.

3.1.3.3 Inhibitorische Effekte von Suramin und NF023 am humanen und rS1P₅-Rezeptor

Neben agonistisch und allosterisch wirkenden Substanzen stellen auch Antagonisten ein wichtiges Merkmal und Werkzeug bei der Charakterisierung von Rezeptoren dar. Daher wurden die Effekte des polyzyklischen anionischen Moleküls Suramin und dessen Analogon NF023 (Strukturformeln siehe im Anhang F, Seite 166) auf die S1P-vermittelte Rezeptor-Aktivierung am h- und rS1P₅-Rezeptor untersucht. Suramin ist bekannt für seine Blockade vieler Rezeptor-Liganden-Interaktionen, zu denen auch die von S1P und LPA gehören (Durieux et al., 1993, Postma et al., 1996). Vor kurzem wurde berichtet, dass Suramin in einem funktionellen Versuch in *Xenopus*-Oocyten einen selektiven S1P₃-Rezeptor-Antagonisten darstellt, der keine Wirkung auf den S1P₁- und S1P₂-Rezeptor (Ancellin und Hla, 1999) zeigt. In Untersuchungen zu den Wirkungen von NF023 an GPCRs konnte gezeigt werden, dass die Substanz einen selektiven P2X-Rezeptor-Antagonisten darstellt, der keine Wirkung auf P2Y-Rezeptor-Subtypen, Adrenozeptoren oder Histamin-Rezeptoren zeigt (Ziyal et al., 1997).

Um die antagonistischen Eigenschaften von Suramin und NF023 auf die S1P-vermittelte [Ca²⁺]_i-Freisetzung zu bestimmen, wurden den hS1P₅- oder rS1P₅-Rezeptor- und Gα_{q15}-exprimierende CHO-K1-Zellen mit steigenden Konzentrationen an Suramin oder NF023 inkubiert, mit S1P (1 μM für den rS1P₅-Rezeptor; 3 μM für den hS1P₅-Rezeptor; diese Konzentrationen entsprechen 85% der S1P-Konzentration mit dem maximalen Effekt am jeweiligen Rezeptor) stimuliert und das jeweils freigesetzte Calcium mit dem FLIPR quantifiziert. Interessanterweise war der hS1P₅-Rezeptor sensitiv gegenüber Suramin- und NF023-Antagonismus. Die S1P-vermittelte Calciumfreisetzung wurde in Gegenwart von 3000 μM Suramin (Abbildung 30 A) sowie auch in Gegenwart von 10000 μM NF023 (Abbildung 30 B) fast komplett gehemmt. Die IC₅₀-Werte für die Hemmung der S1P-induzierten [Ca²⁺]_i-Freisetzung am hS1P₅-Rezeptor lagen bei 1,3 x 10⁻⁴ M beziehungsweise 3,4 x 10⁻⁴ M für Suramin und NF023. Im Gegensatz dazu wurde die rS1P₅-Rezeptor-vermittelte [Ca²⁺]_i-Mobilisierung nur teilweise durch Suramin mit einem IC₅₀-Wert von 5,8 x 10⁻³ M und einer maximalen Hemmung von 50% (Abbildung 30 A) unterdrückt. NF023 konnte eine vollständige Hemmung der rS1P₅-Rezeptor induzierten [Ca²⁺]_i-Freisetzung bewirken, wobei hier der IC₅₀-Wert mit 4 x 10⁻³ M verglichen mit dem des hS1P₅-Rezeptors etwa 10fach höher ist (Abbildung 30 B).

Um sicherzustellen, dass der Suramin- und NF023-Antagonismus am humanen und rS1P₅-Rezeptor nicht auf einen unspezifischen Effekt der Testsubstanzen auf das Koppeln von Rezeptor und G-Protein, sondern auf eine spezifische Inhibition der transmembranären Rezeptoren zurückzuführen ist, wurde folgendes Kontrolllexperiment durchgeführt: Der G α_{q15} -gekoppelte Dopamin-D₂-Rezeptor wurde bei einer Kotransfektion mit G α_{q15} weder von Suramin (Einschub Abbildung 30 A) noch von NF023 (Einschub Abbildung 30 B) gehemmt. Hierdurch konnte ein unspezifischer, genereller Antagonismus von Suramin und NF023 auf die Rezeptor/G-Protein-Kopplung ausgeschlossen werden.

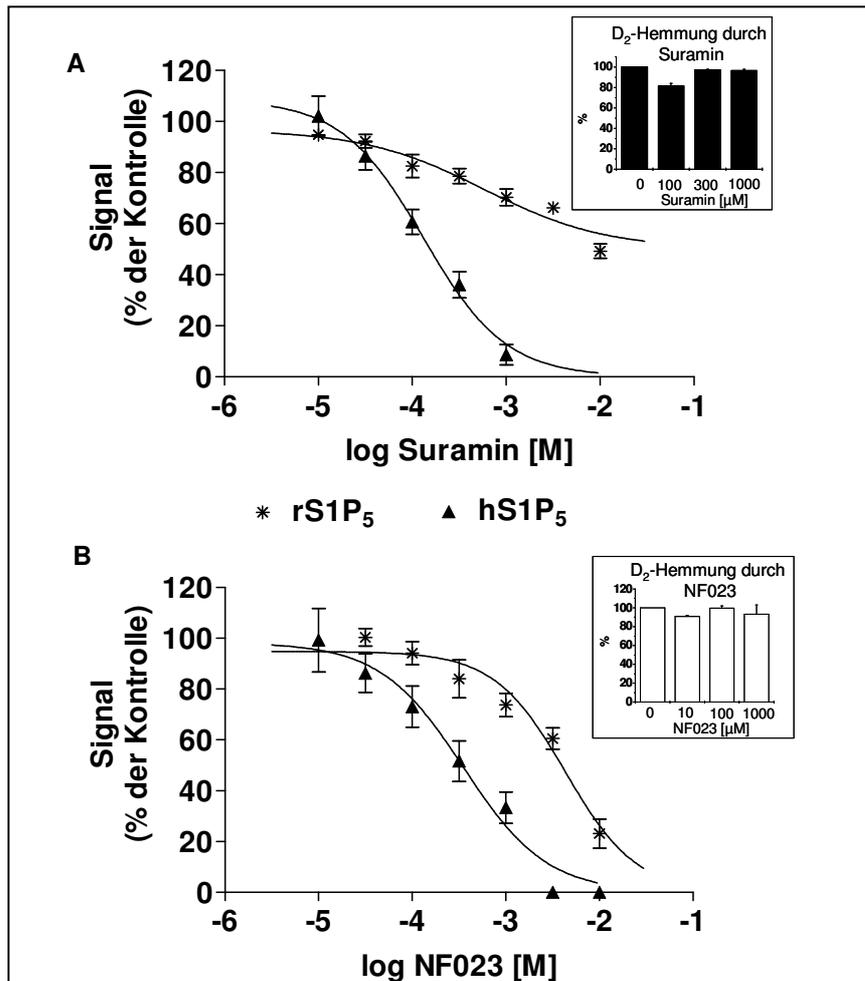


Abbildung 30: **Hemmung der S1P-vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisation durch Suramin (A) und NF023 (8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylen))bis-(1,3,5-naphtalentrifosfonsäure)) (B) in transient mit humanem oder rS1P₅-Rezeptor und G α_{q15} kotransfizierten CHO-K1-Zellen.** CHO-K1-Zellen wurden transient mit dem hS1P₅- oder rS1P₅-Rezeptor und G α_{q15} kotransfiziert, mit steigenden Konzentrationen Suramin (A) oder NF023 (B) inkubiert, anschließend mit 3 μ M (hS1P₅) oder 1 μ M (rS1P₅) stimuliert und $[Ca^{2+}]_i$ mit dem FLIPR gemessen. Die S1P-Konzentration für den jeweiligen Rezeptor entsprach 85% der für die maximale Antwort erforderlichen Menge. 100% = Wert der S1P-Stimulation nach Inkubation mit Puffer. **Einschub:** Hemmung der Dopamin-vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung durch Suramin (A) oder NF023 (B) in CHO-K1-Zellen, die transient mit dem humanen D₂-Rezeptor und G α_{q15} kotransfiziert wurden. Zellen wurden mit 100 nM Dopamin stimuliert und die Calcium-Freisetzung, wie oben beschrieben, gemessen. $\bar{x} \pm$ S.E.M.; n = 3

3.1.4 Funktionelle Untersuchungen am humanen S1P₅-Rezeptor

Im folgenden Kapitel werden die Untersuchungen der funktionellen Eigenschaften des hS1P₅-Rezeptors beschrieben. Die anderen S1P-Rezeptoren wurden hier nicht mit eingeschlossen, da ein Großteil der durchgeführten Versuche für diese Rezeptoren bereits in der Literatur beschrieben worden ist.

Bei den intern durchgeführten Versuchen wurde eine den jeweiligen Rezeptor stabil exprimierende Zelllinie verwendet. Die Untersuchung des rS1P₅-Rezeptors wurde zu Vergleichszwecken immer parallel durchgeführt. Eine Auswahl verschiedener Lipide wurde in den Versuchssystemen getestet, die positive Ergebnisse für S1P lieferten.

Um die Funktionalität der stabilen Zelllinien zu gewährleisten, wurden diese im FLIPR mittels S1P-Stimulation getestet. In Abbildung 31 sind die Dosiswirkungskurven für S1P am hS1P₅-Rezeptor (A) und rS1P₅-Rezeptor (B) in HEK293(PSC)-Zellen dargestellt. Die absoluten Werte für 100% liegen nach Abzug des endogenen Signals zwischen 15000 und 25000 Fluoreszenzeinheiten, womit die Funktionalität der stabilen Zelllinien unter Beweis gestellt wurde.

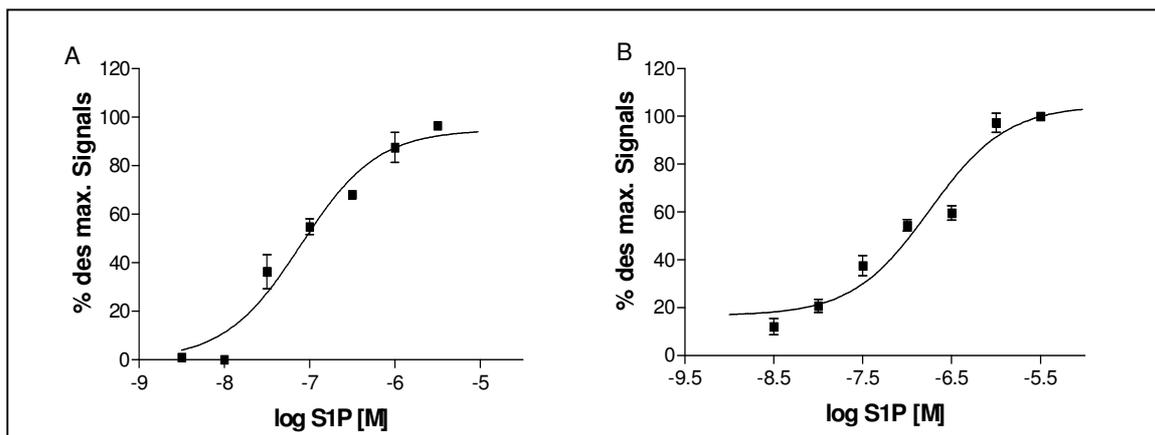


Abbildung 31: **Dosiswirkungskurven für S1P in den hS1P₅-Rezeptor (A) und rS1P₅-Rezeptor (B) stabil exprimierenden Zelllinien.** Die stabilen Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen S1P stimuliert und die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ mit dem FLIPR gemessen. Daten wurden normalisiert und auf die maximale Antwort prozentuiert. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 3$; 100% = 15000-25000 Einheiten

3.1.4.1 GTP γ S-Versuche

Der Austausch von GDP durch GTP γ S erfolgte in Membranpräparation der stabilen hS1P₅- und rS1P₅-Zelllinien nach Inkubation mit 1 μ M S1P, 1 μ M dhS1P sowie zusätzlich 1 μ M Sphingosin (Abbildung 32). Alle anderen Lipide ergaben in einer Konzentration von 1 μ M keine signifikante G-Protein-Aktivierung über den basal (ohne Lipid) gemessenen Werten. Während S1P und dhS1P sowohl am hS1P₅- (A) als auch am rS1P₅- (B) Rezeptor eine bis zu vierfache Aktivierung der GTP γ S-Bindung über basal bewirkten, war der von Sphingosin induzierte Effekt

mit einer ca. zweifachen Aktivierung deutlich schwächer, jedoch statistisch signifikant über den basalen Werten. In Membranpräparationen von Vektor-exprimierenden Zellen konnte durch Lipidzugabe bei keinem der getesteten Lipide ein signifikanter Anstieg des gebundenen [³⁵S]GTP γ S festgestellt werden.

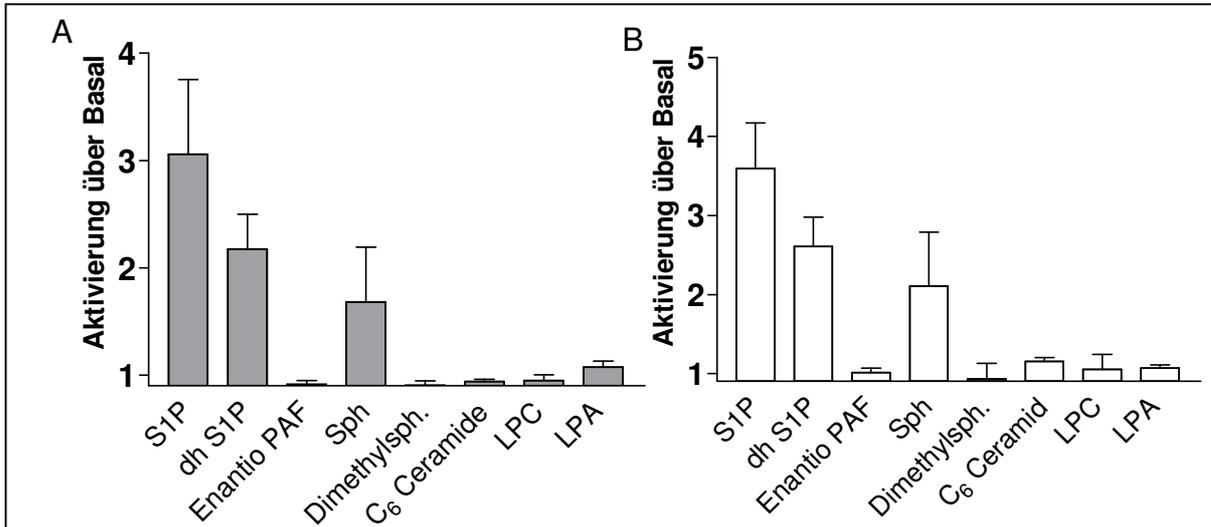


Abbildung 32: **GTP γ S-Bindungsversuche mit Membranen von den hS1P₅-Rezeptor- (A) und den rS1P₅-Rezeptor- (B) exprimierenden Zellen mit 1 μ M der angegebenen Lipide.** Membranen wurden mit den verschiedenen Lipiden inkubiert und anschließend über Radioaktivitätsmessungen im SPA-Versuchsformat (scintillation proximity assay) die Menge an gebundenem [³⁵S]GTP γ S bestimmt. Werte sind in x-fach über basal angegeben. Basale Werte wurden durch Inkubation der Membranen in lipidfreiem Puffer bestimmt. $\bar{x} \pm$ S.E.M.; n = 3-5; Sph: Sphingosin; LPC: Lysophosphatidylcholin.

Die absoluten Messwerte bei allen Versuchen wiesen in Abhängigkeit vom Alter (hierbei war schon ein Tag von entscheidender Bedeutung) des radioaktiven [³⁵S]GTP γ S eine große Streubreite auf. Nach Abzug der basalen Messwerte (im Mittel von 6000 cpm) lagen die Maximalwerte für S1P und dhS1P zwischen 14000 und 28000 cpm (counts per minute), bei Sphingosin im Bereich von 12000–17000 cpm.

Ergebnisse

Abbildung 33 zeigt die im Anschluss an die 1-Punkt-Messungen bestimmten Dosiswirkungskurven für S1P, dhS1P und Sphingosin am hS1P₅-Rezeptor (A) sowie am rS1P₅-Rezeptor (B). Die Einschübe zeigen einen repräsentativen Versuch zur Veranschaulichung des Messfensters.

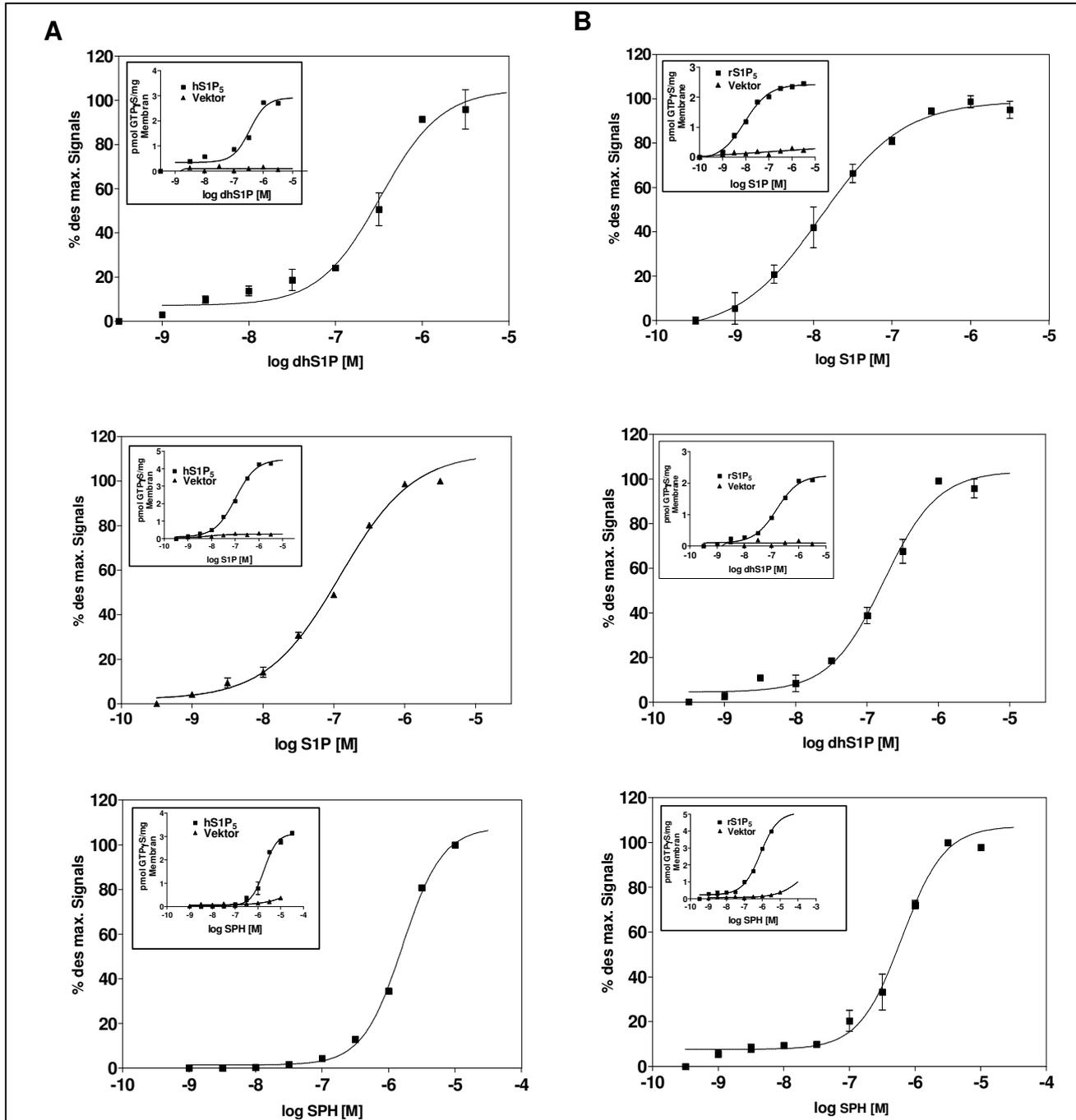


Abbildung 33: **Dosiswirkungskurven für S1P, dhS1P, SPH am hS1P₅-Rezeptor (A) und am rS1P₅-Rezeptor (B) im GTP_γS-Versuch.** Membranen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Lipids inkubiert und die Messung erfolgte wie in Abbildung 32 beschrieben. Nach Abzug der basalen Stimulation wurden die Messwerte auf den höchsten Messwert prozentuiert. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 4-5$. **Einschübe:** Originalmesswerte eines repräsentativen Versuches.

In Tabelle 25 sind die jeweiligen EC₅₀-Werte (nM) im Vergleich zu den schon teilweise publizierten Daten dargestellt. Die zum Teil etwas abweichenden Werte können auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückgeführt werden, die grundsätzliche Tendenz S1P > dhS1P >> Sphingosin (unpubliziert) findet sich jedoch bei allen Untersuchungen wieder.

Tabelle 25: *EC₅₀-Werte (nM) von S1P, dhS1P und Sphingosin in GTP γ S-Bindungsversuchen am hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptor. In der Fußnote sind - soweit bekannt - die publizierten Werte angegeben*

Rezeptor Ligand	hS1P ₅	rS1P ₅
S1P	102,5 ^a	12,5 ^c
dhS1P	310 ^b	170 ^d
Sphingosin	1621	628,5

- a) publizierter Wert: 43,9 nM (Im et al., 2001)
- b) publizierter Wert: 124,4 nM (Im et al., 2001)
- c) publizierter Wert: 90 nM (Im et al., 2000)
- d) publizierter Wert: 90 nM (Im et al., 2000)

Im Folgenden wurden die Effekte von Pertussis-Toxin auf die durch S1P-, dhS1P- und Sphingosin-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung am hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptor gemessen. Da es sich bei Sphingosin um einen neuen Liganden handelte, war die Frage, ob dieser auch über den PTX-sensitiven G α_i -Signaltransduktionsweg wie S1P und dhS1P (Malek et al 2001; Im et al., 2001) wirkt, von besonderem Interesse. Abbildung 34 zeigt deutlich, dass die Effekte aller drei Lipide sowohl am hS1P₅-Rezeptor (A) als auch am rS1P₅-Rezeptor (B) durch Inkubation mit PTX komplett gehemmt wurden und somit G α_i -vermittelt waren.

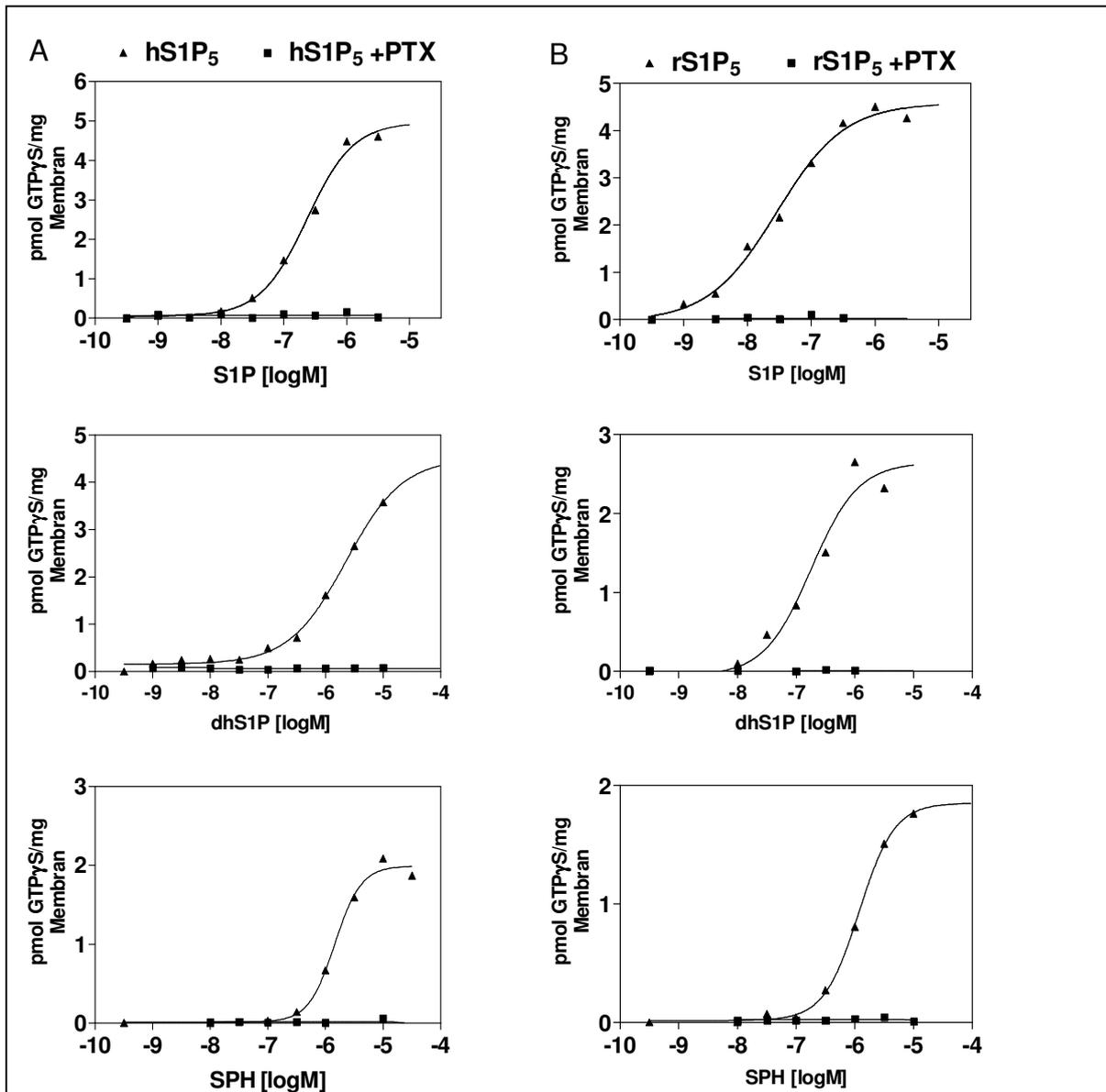


Abbildung 34: **Hemmung der durch S1P, dhS1P und SPH induzierten [³⁵S]GTP γ S-Bindung am hS1P₅-Rezeptor (A) sowie am rS1P₅-Rezeptor (B) durch PTX (Pertussis-Toxin).** Zellen wurden vor der Membranpräparation mit 100 ng/ml PTX oder normalem Medium inkubiert. Die Bestimmung der Dosiswirkungskurven erfolgte wie in Abbildung 32 beschrieben. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.1.4.2 cAMP-Versuche

Die Messung der Effekte vom hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptor auf das cAMP-Niveau - und damit indirekt auf die Aktivität des für die cAMP-Bildung verantwortlichen Enzyms Adenylatzyklase - in der den Rezeptor stabil exprimierenden Zelle ist ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die kardiovaskulären Effekte des *second messengers* cAMP (Muthy 2001, Kalodimos & Ventura, 2001).

Für den rS1P₅-Rezeptor sind die durch G α_i vermittelten inhibitorischen Effekte auf die cAMP-Produktion durch S1P, dhS1P und SPC schon beschrieben worden (Im et al., 2000; Malek et al., 2000). Umso erstaunlicher war folgende, im Laufe unserer Versuche gemachte, noch nicht beschriebene Entdeckung: Sowohl der hS1P₅-Rezeptor als auch das Rattenhomologe reduzierten die basalen cAMP-Konzentrationen unabhängig von einer zusätzlichen S1P-Stimulation. Abbildung 35 zeigt die statistisch signifikante Inhibition der basalen cAMP-Produktion durch alleinige Expression des hS1P₅-Rezeptors und des rS1P₅-Rezeptors nach Kultivierung der Zellen in Medium mit FCS (A), welches ca. 400 nM S1P enthält (Pyne and Pyne, 2000b), sowie nach Kultivierung unter S1P-freien Bedingungen durch Verwendung von Medium mit 10% csFCS (charcoal-stripped FCS, Aktivkohle-absorbiertes FCS) (B).

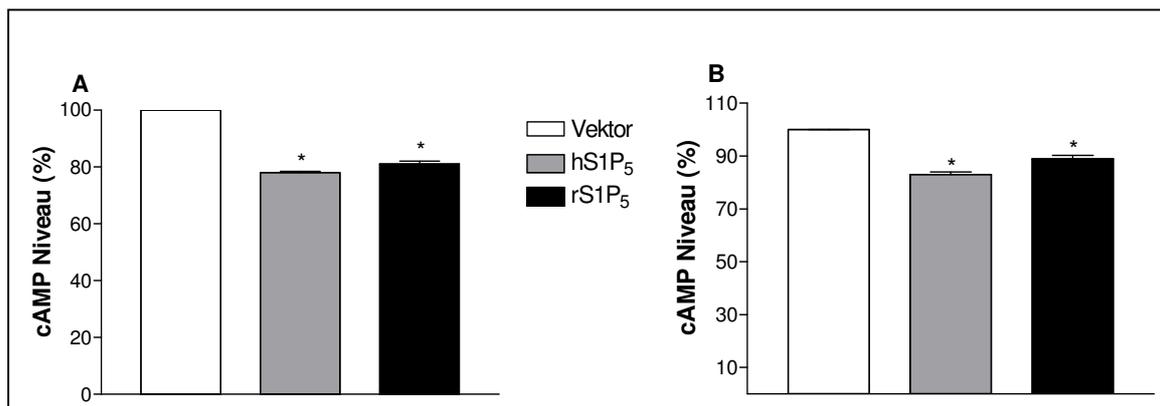


Abbildung 35: **Basale cAMP-Spiegel in HEK293-Zellen, die das angegebene Plasmid stabil exprimieren, nach Kultivierung in FCS (A) oder csFCS (B).** 10000 Zellen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf Ihre basalen cAMP-Niveaus untersucht. cAMP-Niveau in Vektor-exprimierenden Zellen = 100%; $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 9-10$; $p = 0,05$

Die Zugabe von 1 μ M S1P während der Inkubationsphase zu den in csFCS-haltigem Medium kultivierten Zellen ergab keine weitere Erniedrigung der basalen cAMP-Niveaus. Durch die endogenen S1P-Rezeptoren in HEK293-Zellen (Meyer zu Heringdorf et al., 2001) wurde allerdings eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Vektor-exprimierenden Zelle bewirkt (in unseren Versuchen um ca. 10%), während die cAMP-Konzentration in S1P₅-Rezeptor-exprimierenden Zellen (in csFCS kultiviert) mit und ohne S1P-Stimulation in etwa identisch blieb (Abbildung 36 A). Dies lässt auf eine eventuelle Maskierung der S1P-vermittelten

zusätzliche Hemmung der Adenylatzyklase über den S1P₅-Rezeptor durch die stimulierenden Effekte der endogenen S1P-Rezeptoren schließen.

Alle Versuche wurden im Folgenden mit in csFCS-kultivierten Zellen durchgeführt, um einen Einfluss der in normalem FCS vorhandenen Lipide auszuschließen.

Um eine Liganden-vermittelte Hemmung der cAMP-Produktion zu messen, wird zunächst mit Forskolin (einem Diterpenoid, das standardmäßig zur Aktivierung der Adenylatzyklase eingesetzt wird) stimuliert und danach die Hemmung der Forskolin-induzierten Adenylatzyklase-Aktivierung bestimmt. Der Forskolin-Konzentration kommt hierbei eine entscheidende Bedeutung zu. Ist diese zu hoch, kann eine Hemmung nicht mehr gemessen werden, ist diese zu niedrig, wird das Messfenster zu klein, um noch signifikante Aussagen treffen zu können.

Beim Ermitteln der optimalen Forskolin-Konzentration wurde die folgende Beobachtung gemacht: Die Forskolin-induzierte Aktivierung der Adenylatzyklase in den S1P₅-Rezeptor-exprimierenden Zellen fiel immer signifikant geringer aus als in Vektor-exprimierenden Zellen (Abbildung 36 B).

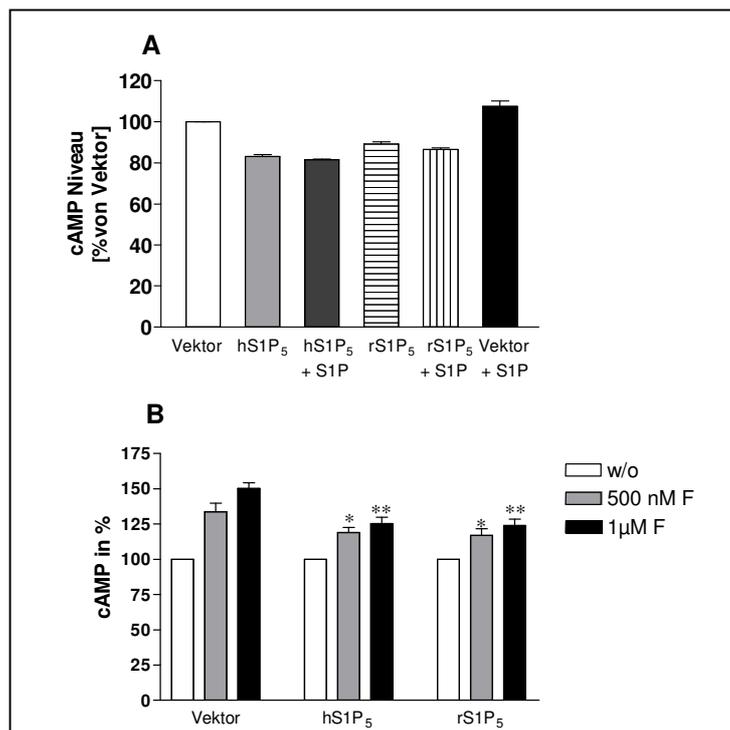


Abbildung 36: **Effekte von S1P und Forskolin auf das basale cAMP-Niveau.** Das cAMP-Niveau in HEK293-Zellen, die das angegebene Plasmid stabil exprimieren, wurde nach Kultivierung in lipidfreiem Medium mit und ohne S1P-Stimulation (A) oder nach Stimulation mit Forskolin (B) wie in Abbildung 35 beschrieben bestimmt. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 6$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Abbildung 37 A zeigt die durch 1 µM S1P hervorgerufene Hemmung der Forskolin-induzierten Adenylatzyklaseaktivierung (500 nM und 1 µM Forskolin; Forskolinwert: 100%) in Vektor-, den hS1P₅-Rezeptor- und den rS1P₅-Rezeptor-exprimierenden Zellen. Forskolin-Konzentrationen

bis 400 nM und ab 2 μ M wurden in Vorversuchen ausgeschlossen. Da die absoluten Werte (nicht gezeigt) bei 1 μ M sich besser zur Auswertung eigneten, wurde in den folgenden Versuchen 1 μ M Forskolin zur Messung der Lipid-induzierten Adenylatzyklasehemmung eingesetzt.

Um einen inhibitorischen Effekt der Lipide auf die Adenylatzyklase messen zu können, musste zunächst ausgeschlossen werden, dass die entsprechenden Substanzen einen eigenen Effekt auf die cAMP-Produktion in der Zelle haben. Wie in Abbildung 37 B gezeigt, hatte keines der eingesetzten Lipide (1 μ M) einen eigenen signifikanten Einfluss auf die cAMP-Menge in der Zelle, der über die für S1P beschriebene 10%ige Induktion hinausging. Alle Werte wurden auf das basale Niveau des jeweiligen Zelltyps prozentuiert.

Bei den darauffolgenden Messungen der Effekte der jeweiligen Lipide auf die Forskolin-stimulierte Adenylatzyklase konnte nur - wie für den rS1P₅-Rezeptor beschrieben (Im et al., 2000) - nach Inkubation mit S1P und dhS1P in den hS1P₅-Rezeptor- und den rS1P₅-Rezeptor-exprimierenden Zellen eine statistisch signifikante Hemmung beobachtet werden (Abbildung 37 C). Alle anderen Lipide zeigten keinen signifikanten Hemmeffekt.

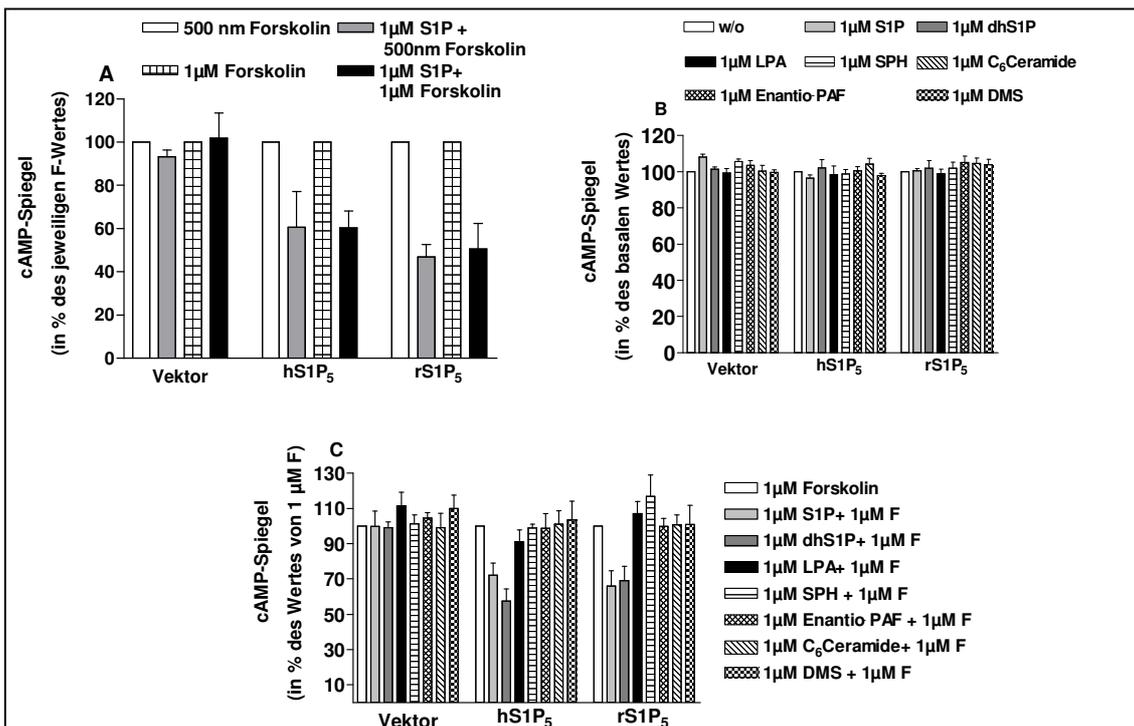


Abbildung 37: **Effekte verschiedener Lipide auf die cAMP-Produktion mit und ohne Forskolin-Stimulation.** Zellen, die das angegebene Plasmid stabil exprimieren, wurden in csFCS-haltigem Medium kultiviert. **A:** Nach Stimulation der Zellen mit 500 nM oder 1 μ M Forskolin in An- oder Abwesenheit von 1 μ M S1P wurde der cAMP-Spiegel bestimmt. Der jeweilige Forskolin-Wert wurde 100% gesetzt. **B:** Die Zellen wurden mit 1 μ M des angegebenen Lipides inkubiert und danach die cAMP-Spiegel bestimmt. 100%: Wert der Inkubation ohne Lipid (w/o). **C:** Nach Inkubation der Zellen mit 1 μ M Forskolin (F) in An- oder Abwesenheit von 1 μ M des angegebenen Lipids wurde die cAMP-Menge bestimmt. 100% = cAMP-Spiegel nach der Inkubation mit 1 μ M Forskolin ohne Lipid. $\bar{x} \pm S.E.M.$; n = 9-10; p = 0,05

3.1.4.3 Rho-Signaltransduktionsweg

Die Aktivierung der kleinen GTPase Rho erfolgt über die $G\alpha_{12/13}$ -Gruppe der G-Proteine und wird unter anderem für morphologische Veränderungen der Zellen verantwortlich gemacht (siehe auch Gutkind 1998). Malek et al. (2001) haben für den $rS1P_5$ -Rezeptor eine Bindung an $G\alpha_{12}$ mittels Immunopräzipitation nachweisen können, allerdings existieren keine Daten, ob es auch zu einer funktionellen Aktivierung von Rho kommt. In dem hier gewählten Versuch mit dem Neurotensin-Rezeptor als Positivkontrolle wird die Rho-Aktivierung indirekt über die SRE-Aktivierung (*serum-response-element*-Aktivierung) nachgewiesen, welches durch Rho angeschaltet wird.

Die Untersuchungen wurden mit verschiedenen Inkubationszeiten (30 min, 60 min, 2 h, 3 h, 4 h) durchgeführt; für alle Zeitpunkte ergab sich ein identisches Bild: Wie in Tabelle 26 (hier ist der 4-h-Zeitpunkt dargestellt) zu erkennen, konnte keine $S1P_5$ -induzierte Aktivierung des Rho-Signaltransduktionsweges durch die $S1P_5$ -Rezeptoren gemessen werden, während der Neurotensinrezeptor einen ~8,5fachen Anstieg der SRE-Menge durch Neurotensin-Stimulation bewirken konnte.

*Tabelle 26: **Aktivierung des Rho-Signaltransduktionsweges in stabilen Zelllinien der jeweiligen Rezeptoren.** Stabile Zellen des jeweiligen Plasmids wurden mit SRE-(serum-response-element-) und TKR-(Tyrosin-Kinase-Renilla-)Plasmiden transient transfiziert, nach 24 h für 4 h mit dem angegebenen Liganden inkubiert und die SRE-Aktivierung gemessen. Die Messwerte wurden auf den internen Standard (TKR) normalisiert. Dargestellt ist die Aktivierung nach 4 h Inkubation mit dem Liganden im Vergleich zu Vehikel- (DMSO-)behandelten Zellen. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 5$; NT: Neurotensin.*

Rezeptor	X-fache Aktivierung	Ligand
Humaner $S1P_5$	$1,83 \pm 0,21$	$3 \mu M$ $S1P$
Ratten $S1P_5$	$1,37 \pm 0,16$	$3 \mu M$ $S1P$
Vektor	$1,81 \pm 0,11$	$3 \mu M$ $S1P$
Humaner NT_1	$8,68 \pm 0,80$	$1 \mu M$ NT

Da es sich bei den stabilen Zellen des Neurotensin-Rezeptors um HEK293-Zellen anderer Herkunft handelte als die im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung der stabilen Zelllinien verwendeten HEK293(PSC)-Zellen, wurde die Anwesenheit der $G\alpha$ - und $G\beta$ -Untereinheiten in den Zellsystemen mittels Western Blot überprüft. So konnte sichergestellt werden, dass ausbleibende Signale nicht durch fehlende α - oder β -Untereinheiten bedingt waren. Der Vollständigkeit halber sind hier alle untersuchten Zellsysteme gezeigt (incl. der stabilen Zelllinien des hGPR45 und des hGPR63; die Ergebnisse werden in Teil II des Ergebnisteils dargestellt).

In Abbildung 38 ist deutlich zu erkennen, dass alle erwarteten G-Protein-Untereinheiten in den Membranpräparationen und somit auch in den lebenden Zellen vorhanden sind: $G\beta$ (E), welches essentiell für jegliche funktionelle Antwort ist; $G\alpha_{12/13}$ (A,B), wodurch die These, die Rho-Aktivierung sei aufgrund fehlender G-Protein-Untereinheiten nicht zustande gekommen, nicht mehr haltbar ist; $G\alpha_q$ (C) und $G\alpha_i$ (D) - dessen Anwesenheit schon durch die Pertussis-Toxinsensitivität im $GTP\gamma S$ -Versuch bewiesen wurde - sowie $G\alpha_s$ (F) (sehr schwaches Signal). Somit sollten alle funktionellen Untersuchungen mit diesen stabilen Zellen durchführbar sein, wenn nicht endogene Hintergrundprobleme das Messfenster zu stark reduzieren. Das Fehlen von $G\alpha_o$ (G) – ein primär im Hirn vorhandenes G-Protein - zeigt, dass nicht unselektiv alle G-Proteine detektiert wurden.

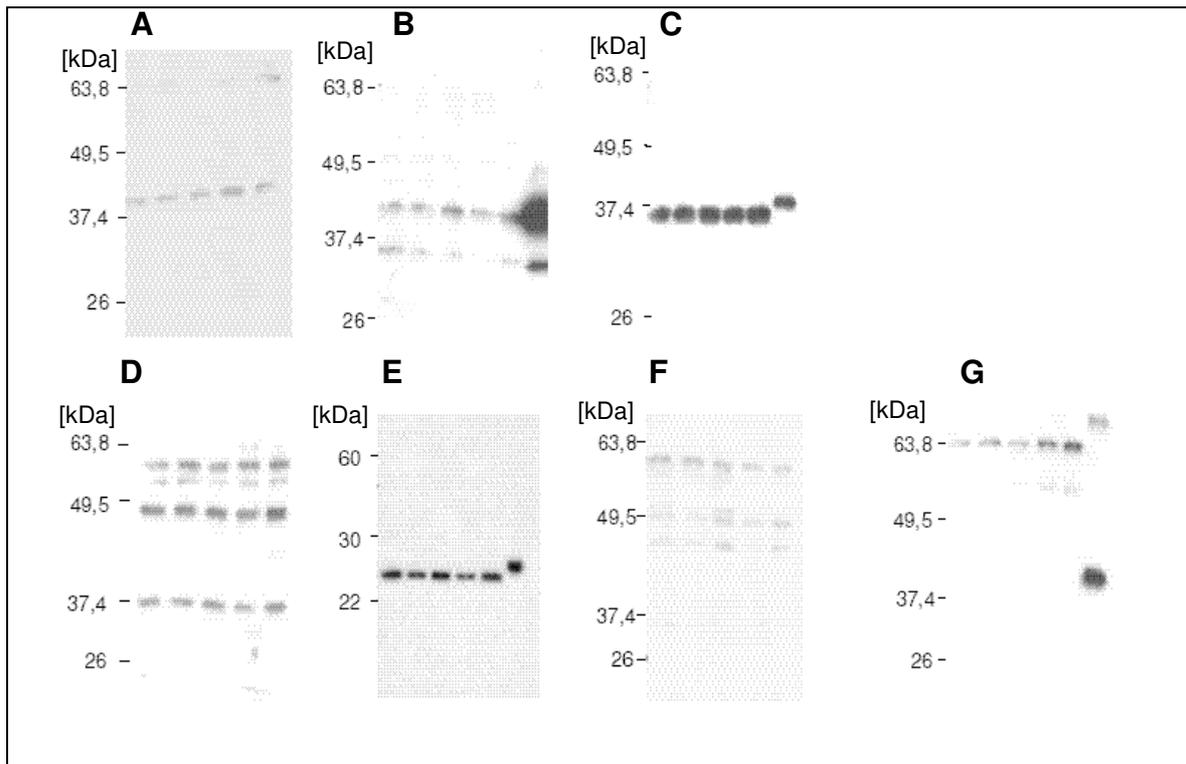


Abbildung 38: **Western-Blot-Analyse der G-Proteine in Membranpräparationen der stabilen HEK293(PSC)-Zelllinien.** Zellmembranen wurden per Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Membranen übertragen, mit primärem und sekundärem Antikörper inkubiert und mit Hilfe des entsprechenden Detektionsreagenzes im Fujifilm-FPM800A-Gerät analysiert. Die im Folgenden angegebene Reihenfolge der aufgetragenen Präparationen ist bei allen Blots identisch: hS1P₅, rS1P₅, Vektor, hGPR63, hGPR45, falls vorhanden pos. Kontrolle; A: $G\alpha_{13}$ (40 kDa); B: $G\alpha_{12}$ (42 kDa); C: $G\alpha_q$ (42 kDa); D: $G\alpha_i$ (40 kDa); E: $G\beta$ (26 kDa); F: $G\alpha_s$ (47 kDa); G: $G\alpha_o$ (40 kDa). Die Banden der jeweiligen Größenmarker sind links in kDalton (kDa) angegeben.

3.1.4.4 ERK-Phosphorylierung

Die Aktivierung der ERK (*extracellular signal regulated kinase*) wurde schon für mehrere S1P-Rezeptoren (S1P_{1,2,3}) beschrieben (siehe Tabelle in Malek et al., 2001). Im Gegensatz dazu hemmt der rS1P₅-Rezeptor als einziger der untersuchten S1P-Rezeptoren die ERK-Phosphorylierung (Malek et al., 2001). Die Serin/Threonin-Kinasen ERK1/2 gehören zur MAP-(mitogen-activated protein-)Kinasen-Superfamilie und werden durch Phosphorylierung homologer Threonin- und Serinreste durch spezifische MAP-Kinasen-Kinasen aktiviert. Daher kann über den Grad der Phosphorylierung der MAP-Kinasen-Familien-Mitglieder ihr Aktivierungszustand bestimmt werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden von Herrn Dr. A. Blaukat (Universität Heidelberg) bereitgestellt. Es wurde nur der hS1P₅-Rezeptor in die Untersuchung mit einbezogen. Wie man in Abbildung 39 erkennen kann, führte die Expression des hS1P₅-Rezeptors in CHO-K1-Zellen zu einer Hemmung der ERK-Phosphorylierung im Vergleich zu Vektor-transfizierten (mock-transfizierten) Zellen, unabhängig davon, ob die Inkubation in lipidfreiem (B) oder lipidhaltigem (A) FCS erfolgte. Die zusätzliche Inkubation mit S1P hatte keine weiteren Effekte auf die ERK-Phosphorylierung, weder hemmend noch stimulierend. Die fehlenden bzw. nicht detektierbaren Effekte von S1P waren unabhängig von dem zur Inkubation der Zellen verwendeten Medium: Weder nach Verwendung von FCS-haltigem (A) noch von csFCS-haltigem (B) Medium zeigte S1P einen Effekt. Auch über mehrere Zeitpunkte hinweg (15 min, 30 min, 60 min, 90 min) konnte keine signifikante Wirkung von S1P beobachtet werden (Abbildung 39). Da in diesem Versuchsformat mit dem bekannten Liganden S1P kein signifikanter Effekt detektierbar war, wurde auf eine Charakterisierung der in allen anderen funktionellen Untersuchungen eingesetzten Lipide verzichtet.

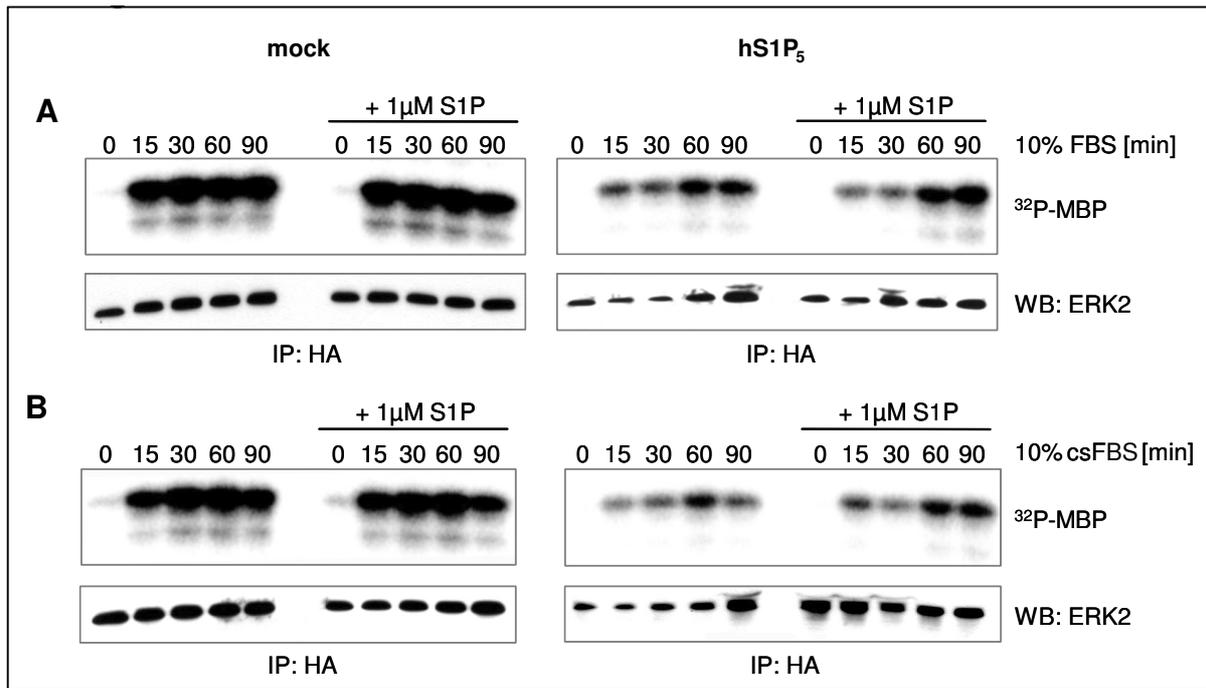


Abbildung 39: **Effekte des hS1P₅-Rezeptors auf die ERK-(extracellular-signal-regulated-kinase)-Phosphorylierung in CHO-K1-Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten (mock-transfizierten) Zellen.** CHO-K1-Zellen wurden transient mit dem hS1P₅-Rezeptor oder Vektor (mock) transfiziert, in Medium mit 10% FCS (A) oder 10% csFCS (B) kultiviert und die ERK-Phosphorylierung mit oder ohne S1P-Stimulation, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von 2-4 unabhängigen Versuchen. (Die gezeigten Ergebnisse wurden von Herrn A. Blaukat zur Verfügung gestellt).

3.1.4.5 Gβ/γ-vermittelte [Ca²⁺]_i-Freisetzung; Bestimmung mittels Aequorin

Die Mobilisierung von [Ca²⁺]_i durch Gα_i-gekoppelte Rezeptoren fällt verglichen mit der eines an Gα_q koppelnden Rezeptors deutlich geringer aus (Xing et al., 2000), und es ist daher schwer bis unmöglich, diese mit der FLIPR-Technologie zu detektieren. In CHO-K1-Zellen ist daher zur Messung der S1P-induzierten [Ca²⁺]_i-Freisetzung über den S1P₅-Rezeptor die Kotransfektion eines promiskuitiven G-Proteins erforderlich. Es handelt sich hier also nicht um den nativen, sondern um einen künstlichen Signaltransduktionsweg. Um zu untersuchen, ob sich für die getesteten Lipide auch bei der [Ca²⁺]_i-Freisetzung über den Gβ/γ-Signaltransduktionsweg – hier ist keine G-Protein-Kotransfektion erforderlich - ein mit dem FLIPR-Versuch vergleichbares Bild hinsichtlich Lipidprofil und Potenz ergibt, wurde die Lipid-induzierte [Ca²⁺]_i-Freisetzung des hS1P₅ via Gβ/γ von Herrn S. Tunaru (Universität Heidelberg) untersucht. Bei dieser alternativen, hoch sensitiven Methode wird Aequorin als Calcium-Sensor verwendet (Parnot et al., 2000; Kotani et al., 2001; Le Poul et al., 2002). Durch Verwendung eines Aequorin-GFP-Fusionskonstruktes kann die Sensitivität noch erhöht werden (Baubet et al., 2001). Abbildung 40 zeigt, dass die S1P- und dhS1P-induzierte [Ca²⁺]_i-Freisetzung in CHO-K1-Zellen bei Verwendung des Aequorin-Prinzips ohne Zugabe eines promiskuitiven G-Proteins möglich ist. Allerdings werden hier auch die Nachteile des

Systems deutlich: Die hohe Sensitivität führt zu starken endogenen Signalen, so dass das Messfenster insbesondere bei dhS1P sehr ungünstig wird. Der hohe Hintergrund von LPA ist wie in den anderen Versuchen auch zu erwarten gewesen.

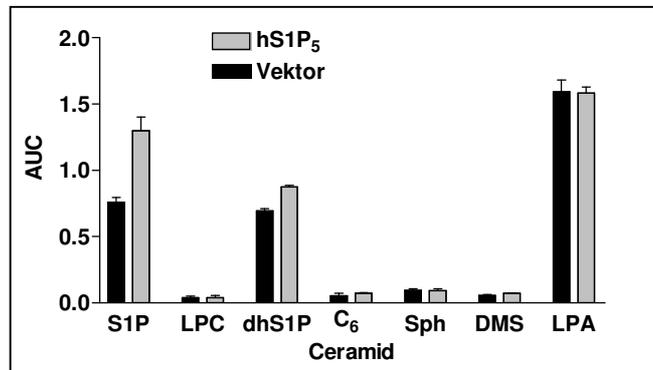


Abbildung 40: $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung in transient mit Vektor oder hS1P₅-Rezeptor transfizierten CHO5A-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Lipiden. CHO5A-Zellen wurden transient mit Vektor oder dem hS1P₅-Rezeptor transfiziert und die durch das jeweilige Lipid induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung mittels Aequorin wie in Material und Methode beschrieben gemessen. Die Konzentration betrug für alle Lipide 3 μ M. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 3$

Die Dosiswirkungskurven (Abbildung 41) von S1P und dhS1P verdeutlichen nochmal das Problem der zu hohen Sensitivität. Mit einem EC₅₀-Wert von 1 μ M kann S1P noch eine vom endogenen Signal (Vektor) trennbare $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung induzieren (A), während beim dhS1P (B) die Kurven des Lipides mit denen des Hintergrundes zusammenfallen.

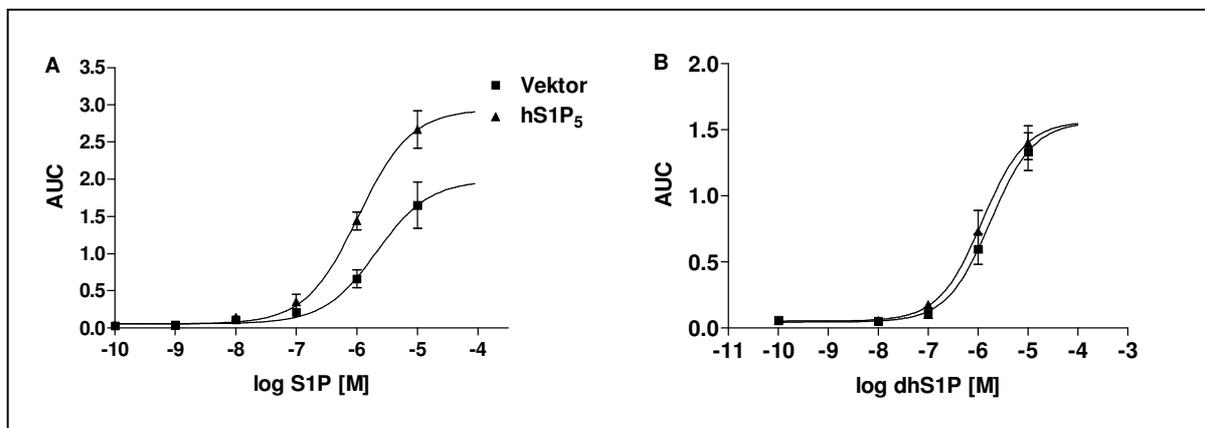


Abbildung 41: S1P- (A) und dhS1P- (B) induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung in transient mit Vektor oder dem hS1P₅-Rezeptor transfizierten CHO5A-Zellen. CHO5A-Zellen wurden transient mit Vektor oder hS1P₅-Rezeptor transfiziert und die S1P-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung mittels Aequorin wie in Material und Methode beschrieben gemessen. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 3$

Die S1P-Signale waren im Aequorin-Versuch komplett durch PTX hemmbar (keine Abbildung), für dhS1P wurde diese Bestimmung nicht durchgeführt.

3.1.5 Effekte des hS1P₅-Rezeptors bei Zellexpression

Expression von GPCRs kann zu verschiedenen Effekten auf das Erscheinungsbild sowie auf das Verhalten und den Zustand der Zellen führen. Diese werden im Folgenden für den hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptor beschrieben und die Rezeptorinternalisierung exemplarisch am hS1P₅-Rezeptor dargestellt.

3.1.5.1 Effekte auf die Zellmorphologie

Cell rounding (Rundung von Zellen) wird als eine der möglichen Vorstufen der Apoptose – dem programmierten Zelltod - angesehen. Für S1P ist im nanomolaren Konzentrationsbereich beobachtet worden, dass es diese Veränderung der Zellmorphologie hervorrufen kann (Postma et al., 1996). Van Brocklyn et al. (1999) zeigten, dass durch Transfektion von S1P₃- und Ratten-S1P₂-Rezeptor (H218) in HEK293-Zellen sowohl *cell rounding* als auch Apoptose induziert wurden, während der S1P₁-Rezeptor keinen Effekt auf die Zellmorphologie hatte. Für den humanen und rS1P₅-Rezeptor sind noch keine Untersuchungen auf diesem Gebiet beschrieben worden. Da im Laufe der FLIPR-Versuche bei Beobachtung der Zellen 24-48 h nach der Transfektion der Eindruck einer morphologischen Veränderung der Zellen entstand, lag es nahe, dieser mit einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung nachzugehen. Zum Vergleich wurde der rS1P₂-Rezeptor zu den Untersuchungen hinzugefügt. Durch Kotransfektion mit GFP konnten die transfizierten CHO-K1-Zellen im Fluoreszenzmikroskop in grüner Farbe nachgewiesen werden.

Wurden die Zellen 34 h nach der Transfektion in Medium mit 10% FCS kultiviert, wiesen die meisten der den hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptor-exprimierenden Zellen deutliches *cell rounding* auf, während den rS1P₂-Rezeptor-exprimierende Zellen nur teilweise ihre Morphologie änderten (Abbildung 42, 1 + 2). Mit steigendem Expressionsniveau (steigender Intensität der grünen Farbe) stieg auch die Intensität der Rundung. Durch Vektor-Transfektion wurde keine Induktion morphologischer Veränderungen beobachtet (Abbildung 42, 1 + 2). Wurden die Zellen nach der Transfektion in Medium mit 10% csFCS kultiviert (Abbildung 42, 3 + 4), zeigte sich auch hier *cell rounding* in den den humanen und rS1P₅-Rezeptor-exprimierenden Zellen, wenngleich in einem geringeren Ausmaß als nach Kultivierung mit 10% FCS. Transfektion des rS1P₂-Rezeptors hatte keinen Einfluss mehr auf die Zellmorphologie, wenn die Kultivierung in csFCS erfolgte.

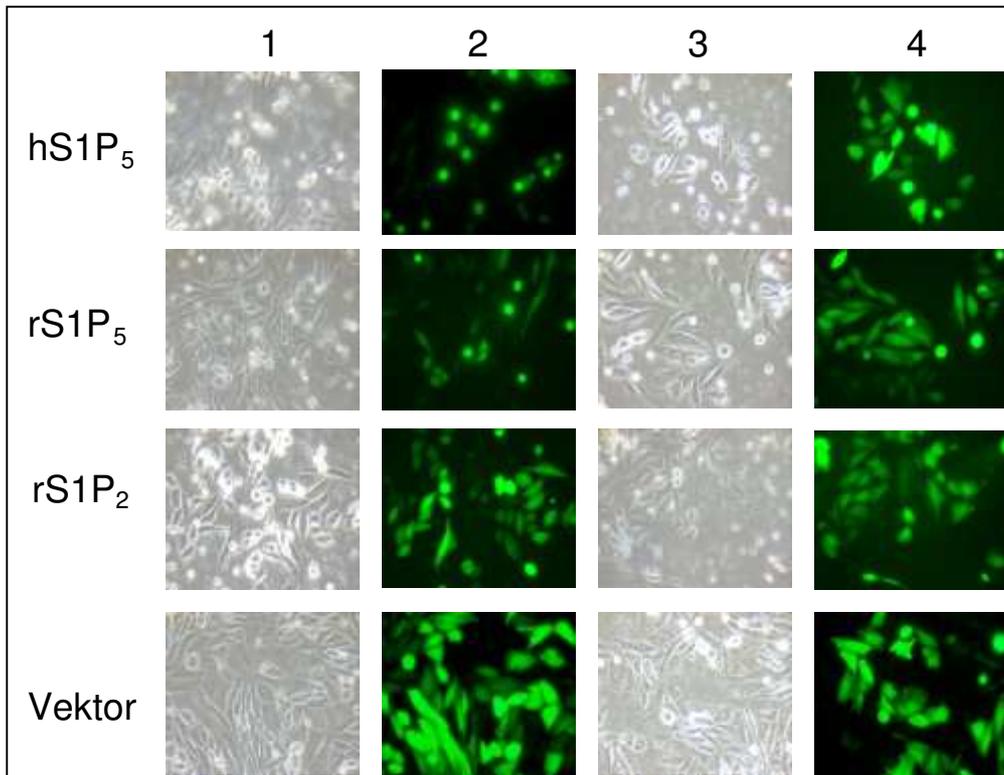


Abbildung 42: **Zellrundung in CHO-K1-Zellen nach transienter Transfektion mit den angegebenen Plasmiden und Kultivierung in FCS (1, 2) und csFCS (3, 4).** CHO-K1-Zellen wurden transient mit den angegebenen Plasmiden und einem für ein grün-fluoreszierendes-Protein-(GFP-)kodierenden Plasmid kotransfiziert (4:1), 34 h in FCS-haltigem (1, 2) oder csFCS-haltigem (3, 4) Medium kultiviert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Um zu klären, ob die beobachtete Abrundung der Zellen evtl. $G\alpha_i$ vermittelt sein könnte, wurden die Zellen wie beschrieben kultiviert, wobei 24 h vor der mikroskopischen Untersuchung 100 ng/ml PTX zum Medium hinzugefügt wurden. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung war kein Unterschied zu den PTX-frei kultivierten Zellen zu sehen. Während den hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptor-exprimierende Zellen eine deutliche Rundung aufwiesen, war in Vektor-exprimierenden Zellen keine veränderte Morphologie zu beobachten (keine Abbildung).

3.1.5.2 Effekte auf die Zellproliferation

S1P ist in der Lage, über die Rezeptoren S1P₂, S1P₃ und eventuell S1P₁ (An et al., 2000; Wang et al 1999; Kimura et al., 2000) das Zellwachstum zu stimulieren. Im Gegensatz dazu haben Malek et al. (2001) vor kurzem die hemmenden Effekte des rS1P₅-Rezeptors auf die Zellproliferation in transient transfizierten CHO-K1-Zellen aufgezeigt. Es stellte sich nun die Frage, ob der humane S1P₅-Rezeptor die gleichen antiproliferativen Eigenschaften in CHO-K1-Zellen wie sein Ratten-Homologes aufweist. Als Positivkontrolle wurde auch der rS1P₅-Rezeptor untersucht, um den direkten Vergleich zu ermöglichen.

Abbildung 43 zeigt, dass der rS1P₅-Rezeptor die Zellproliferation wie erwartet nach Stimulation mit 1 μ M S1P für 48 h signifikant hemmen konnte, während im Gegensatz dazu der

hS1P₅-Rezeptor keine antiproliferativen Wirkungen hatte. Ein intrinsischer (ligand-unabhängiger) Effekt auf das Zellwachstum in csFCS konnte weder für den humanen noch für den rS1P₅-Rezeptor beobachtet werden. Es bleibt zu erwähnen, dass die antiproliferativen Wirkungen von S1P durch die beiden untersuchten GPCRs zunächst zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (24 h, 36 h, 48 h) wurden. 24 h nach S1P-Stimulation waren die antiproliferativen Effekte des rS1P₅-Rezeptors kaum messbar (keine Abbildung). Nach 36 h zeigte sich ein schwach messbarer Effekt (keine Abbildung), der 48 h nach der S1P-Stimulation hoch signifikant wurde.

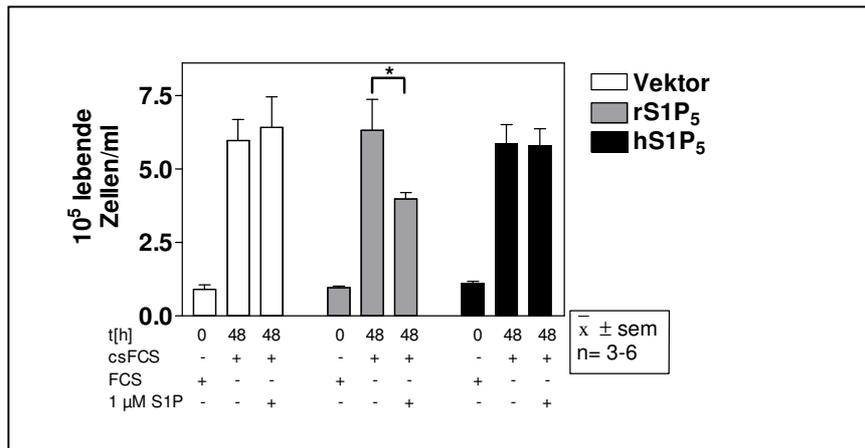


Abbildung 43: **Einfluss des hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptors auf die Zellproliferation nach Inkubation mit 1 μM S1P.** CHO-K1-Zellen wurden transient mit dem angegebenen Plasmid transfiziert. Nach 12 h wurden die Zellen für 48 h in csFCS-haltigem Medium in An- oder Abwesenheit von 1 μM S1P kultiviert und anschließend im Zellzähler gezählt. $\bar{x} \pm$ S.E.M.; n = 3-6

Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Transfektion des hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptors in HEK293-Zellen beobachtet. Während beide Rezeptoren keine Agonist-unabhängigen Effekte auf die Zellproliferation hatten, verhielt sich der rS1P₅-Rezeptor im Gegensatz zum hS1P₅-Rezeptor nach einer Inkubation mit 1 μM S1P für 48 h antiproliferativ (keine Abbildung).

3.1.5.3 Apoptoseinduktion

Da das in Abschnitt 3.1.5.1 beschriebene *cell rounding* eine Vorstufe der Apoptose darstellen kann, wurden - wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben - zur Bestimmung der apoptotischen Wirkungen des hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptors zwei verschiedene Methoden angewendet.

Zunächst wurden Zellen, die in 10% FCS-haltigem Medium kultiviert worden waren (hier war das *cell rounding* deutlich ausgeprägter), mit DAPI (4', 6-Diamino-2-phenylidol) angefärbt, um zu untersuchen, ob die Rezeptor-exprimierenden Zellen (grüne Färbung, Abbildung 44, 3) zusätzlich eine DNA-Fragmentierung aufweisen (blaue Färbung, Abbildung 44, 2). Eine Blaufärbung würde auf apoptotische Ereignisse in den Zellen hinweisen. In Abbildung 44 wird deutlich, dass weder mit dem humanen oder dem rS1P₅-Rezeptor - noch mit dem rS1P₂-Rezeptor - oder mit Vektor-transfizierte Zellen DNA-Fragmentierung und somit Apoptose aufwiesen.

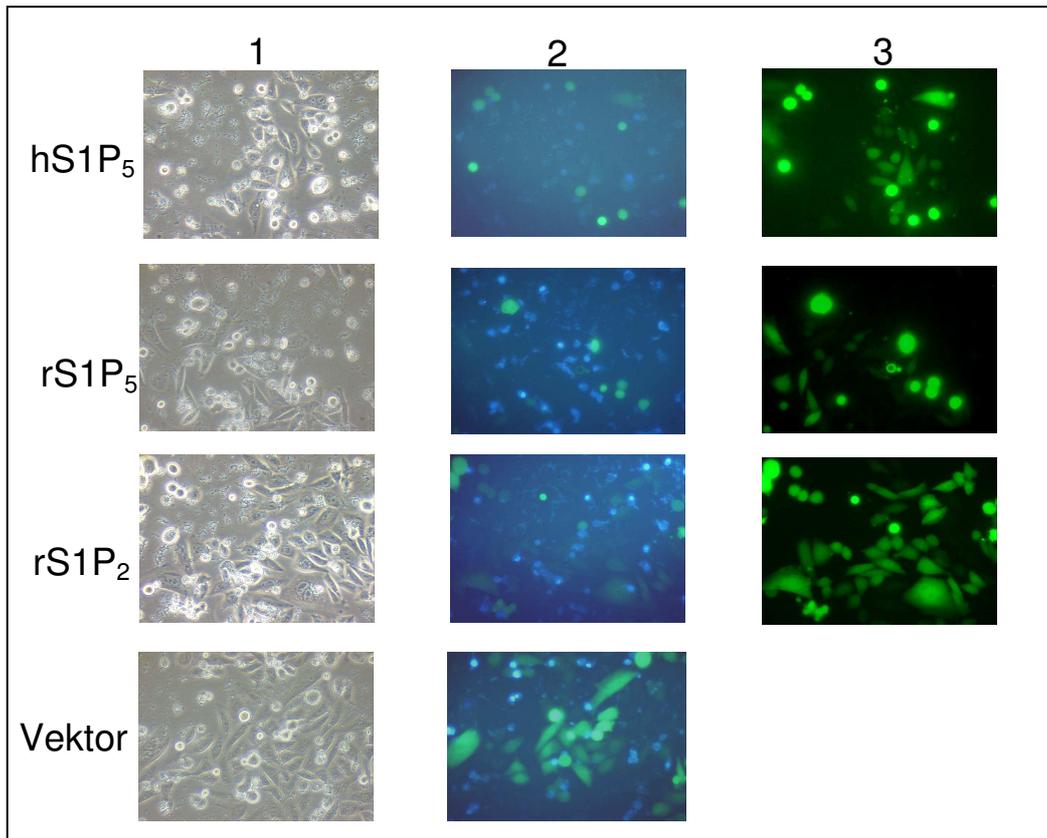


Abbildung 44: **Untersuchung auf apoptotische Effekte in mit dem angegebenen Plasmid transient transfizierten CHO-K1-Zellen mittels DAPI-Färbung.** Der Versuch wurde - wie in Abbildung 43 beschrieben - durchgeführt. Vor der mikroskopischen Analyse erfolgte zusätzlich eine Anfärbung mit DAPI. Dargestellt ist ein repräsentativer Ausschnitt des gesamten Zellrasens.

Obwohl die DAPI-Färbung keinen Hinweis auf Apoptose ergab, wurden die Effekte von S1P auf die Caspase-Aktivierung in den hS1P₅- und rS1P₅-Rezeptor-exprimierenden Zellen untersucht. Caspase-Aktivierung - ein mit der Apoptose zusammenhängender zellulärer Prozess (Nicholson D.W. and Thornberry N.A. 1997; Andersson et al, 2000) - tritt vor der durch DAPI-Färbung detektierten DNA-Fragmentierung auf und könnte somit dennoch involviert sein. Vektor- und rS1P₂-Rezeptor-Transfektion dienten wiederum zur Kontrolle.

Abbildung 45 zeigt, dass die zweistündige Inkubation der mit dem jeweiligen Plasmid transient transfizierten CHO-K1-Zellen mit 100 nM, 300 nM und 1 µM S1P in serumfreiem Medium, unabhängig vom transfizierten Plasmid, weder eine Hemmung noch eine Induktion der Caspase-Aktivität bewirkte. Im Gegensatz dazu bewirkte die Inkubation mit 10% FCS-haltigem Medium eine signifikante Reduktion der Caspase-Aktivität im Vergleich zu serumfrei-inkubierten Zellen. Die Inkubation mit 5 µM Staurosporin erhöhte die Caspase-Aktivität um das ~zweifache. Da es Hinweise gibt, dass Caspase nicht in jedem Fall in den ersten Stunden der Apoptose involviert sein muss (Dumont et al., 2000), wurden die Versuche zusätzlich mit einer Inkubationszeit von 7 h durchgeführt. Auch hier konnte keine Induktion der Caspase-Aktivität durch S1P beobachtet werden. Nur die Staurosporin-induzierte Caspaseaktivierung stieg hier um das ~fünffache (keine Abbildung).

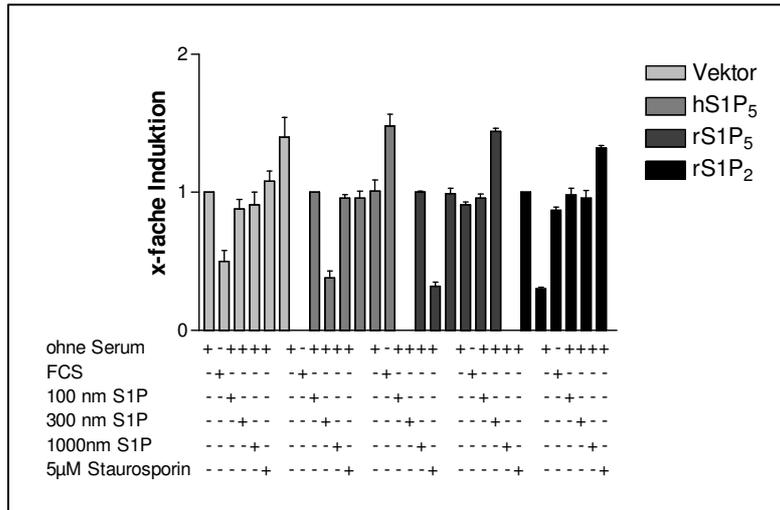


Abbildung 45: **Caspaseaktivierung durch S1P in CHO-K1-Zellen nach transienter Transfektion des angegebenen Plasmids.** Transfizierte CHO-K1-Zellen wurden 6 h vor dem Versuch in serumfreiem Medium kultiviert. Danach wurden sie 2 h lang mit der angegebenen S1P-Konzentration (S1P wurde in serumfreiem Medium gelöst) oder Staurosporin (gelöst in serumfreiem Medium) oder Medium mit 10% FCS oder serumfreiem Medium alleine inkubiert. Die Caspaseaktivität wurde über Fluoreszenzmessungen mit dem Homogenous-Caspases-Assay[®]-Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt. $\bar{x} \pm S.E.M$; n = 8

3.1.5.4 Rezeptorinternalisierung

Das beschriebene *cell rounding* sowie die beobachtete konstitutive Internalisierung in den hS1P₅-Rezeptor-exprimierenden Zellen erschwerten die semiquantitative Bestimmung der S1P-induzierten Rezeptorinternalisierung via hS1P₅-GFP-Konstrukt (dieses wurde freundlicherweise von Frau A. Hattenberger, Aventis Pharma, zur Verfügung gestellt) in CHO-K1-Zellen. Der Versuch, durch Wechseln der Zellart diesen Schwierigkeiten auszuweichen, schlug - wie in Abbildung 46 exemplarisch für HEK293-Zellen gezeigt – fehl. (Es wurden von Herrn Priv. Doz. Dr. T Schöneberg (FU Berlin) sowohl HEK293-, NIH3T3-Zellen sowie COS-7-Zellen untersucht.)

Abbildung 46 A-1 zeigt deutlich, dass die transfizierten, grünen Zellen komplett abgerundet waren, während die untransfizierten HEK293-Zellen (Abbildung 46 A-2) die langgestreckte, typische Morphologie der HEK293-Zellen aufwiesen. Wurde auf die Einzelzellebene fokussiert, zeigten die meisten der transfizierten Zellen das in Abbildung 46 B 1-3 gezeigte Bild, in dem der Großteil des Rezeptors als „Klumpen“ neben dem Golgiapparat lokalisiert ist. Abbildung 46 C1-3 zeigt wiederum vereinzelt beobachtete Zellen, in denen noch eine differenzierbare, membranständige Lokalisation des Rezeptors zu erkennen war. Diese Befunde zeigen sehr deutlich, dass der hS1P₅-Rezeptor sowohl intrazellulär als auch membranständig in der Zelle vorhanden ist und unterstützen die Beobachtungen der konstitutiven Aktivität, da die gezeigten Zellbilder nach Kultivierung in lipidfreiem Medium entstanden sind. Dennoch sind aufgrund der

sehr geringen Menge an Zellen mit membranständiger Lokalisation keine semiquantitativen Aussagen zur S1P-induzierten Rezeptorinternalisierung möglich.

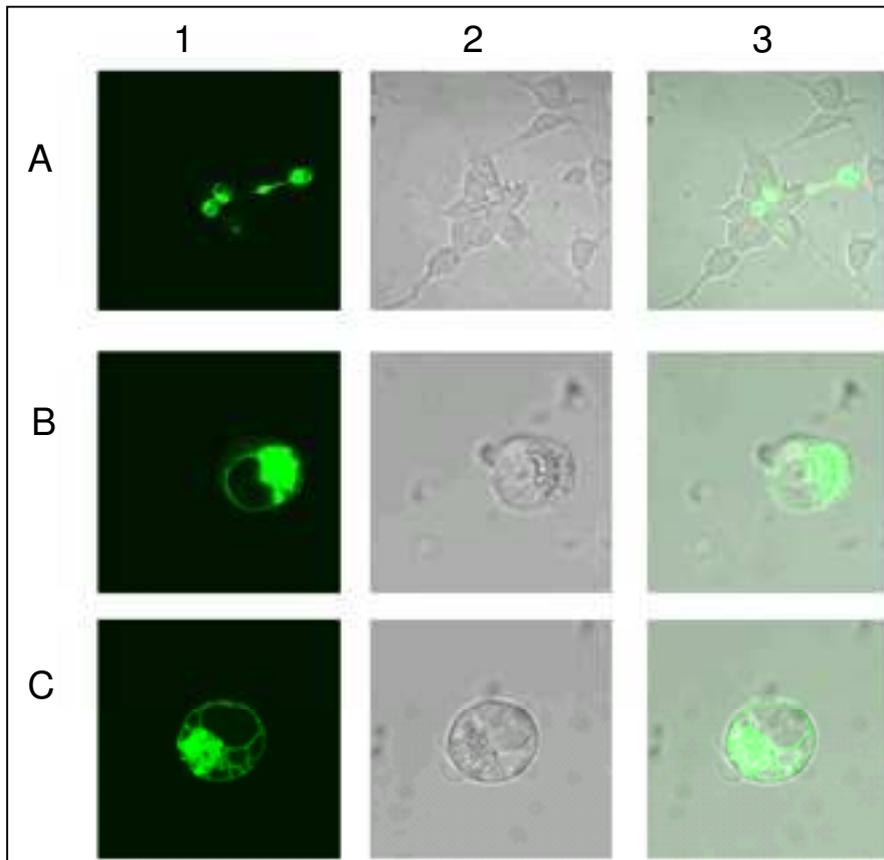


Abbildung 46: **Zellrundung in HEK293-Zellen nach transienter Transfektion eines hS1P₅-Rezeptor-GFP-Konstruktes.** HEK293-Zellen wurden transient mit dem hS1P₅-Rezeptor-GFP-Konstrukt transfiziert und nach 36 h fluoreszenzmikroskopisch analysiert. 1: Bild nach Fluoreszenzanregung; 2: Phasenkontrastbild; 3: Überlagerung von Phasenkontrast und Fluoreszenz. In **A** ist die Morphologie der überwiegenden Zellen als Übersichtsbild gezeigt. **B** zeigt die typische, hauptsächlich beobachtete Morphologie einer Einzelzelle. In **C** ist die vereinzelt beobachtete Membranlokalisation des hS1P₅-Rezeptor-GFP-Konstruktes gezeigt.

Daher wurde die Untersuchung, ob durch S1P-Zugabe zusätzlich zur konstitutiv vorhandenen intrazellulären Lokalisation eine Internalisierung bewirkt werden kann, im Labor von Herrn Priv. Doz Dr. T. Schöneberg (FU Berlin) mittels Transfektion von COS-7-Zellen mit einem HA-getagtem hS1P₅-Rezeptor-Konstrukt und einem anschließenden Oberflächen-ELISA durchgeführt.

Das HA-Tag-S1P₅-Rezeptor-Konstrukt wurde zunächst mit der FLIPR-Technologie (siehe Abschnitt 2.2.3.1) durch Aufnahme einer S1P-Dosis-Wirkungskurve (DRC) auf Funktionalität getestet. Diese war vergleichbar mit der parallel aufgenommenen DRC mit dem pcDNA3.1-S1P₅-Konstrukt (keine Abbildung), das Konstrukt folglich funktionell.

In Abbildung 47 wird deutlich, dass schon die Inkubation mit 20 nM S1P eine hoch signifikante ~ 10%ige Internalisierung bewirkte, während es bei 200 nM S1P zu einer weiteren signifikanten Abnahme der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche auf insgesamt ~ 19% kam. Auf die Inkubation mit höheren S1P-Konzentrationen wurde verzichtet, da hierdurch ein Abrunden und anschließendes Ablösen der Zellen induziert wurde und somit keine zuverlässige Quantifizierung mehr möglich war. Es sei darauf hingewiesen, dass die Bestimmung des Messfensters mit untransfizierten Zellen und dem gut an der Zelloberfläche exprimierenden Vasopressin-(V₂-)Rezeptor erfolgte. Die Expression des hS1P₅-Rezeptors an der Zelloberfläche ohne S1P-Stimulation lag bei ca. 42% der Vasopressinkontrolle. Da es sich bei den Plasmiden des V₂-Rezeptors und des hS1P₅-Rezeptors jedoch um Konstrukte mit unterschiedlichen Promotoren handelt und auch das allgemeine Expressionsverhalten der Rezeptoren unterschiedlich sein kann, kann dieser Befund die visuelle, mikroskopische Beobachtung der konstitutiven Internalisierung bestenfalls unterstützen, jedoch nicht definitiv beweisen.

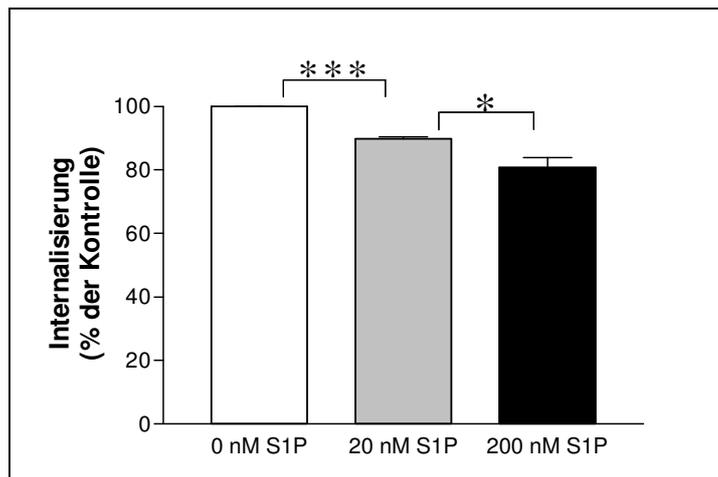


Abbildung 47: **Effekte von S1P auf die Oberflächenexpression des hS1P₅-Rezeptors in transient transfizierten COS-7-Zellen.** COS-7-Zellen wurden transient mit den hS1P₅-HA-TAG-Konstrukt transfiziert, mit den angegebenen S1P-Konzentrationen inkubiert und die Oberflächenexpression des Rezeptors mittels ELISA bestimmt. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$, $\bar{x} \pm S.E.M$, $n = 2-4$

3.2 Der humane GPR63

In diesem Kapitel werden die Identifizierung des hGPR63 sowie die mit diesem Rezeptor und – soweit sinnvoll und möglich - seinem Homologen hGPR45 durchgeführten Untersuchungen dargestellt.

Im Rahmen weiterer bioinformatischer Untersuchungen wurde eine zusätzliche Sequenz identifiziert, die eine hohe Homologie zum hGPR45 (Marchese et al., 1999) aufwies. Von diesem sind noch keine Liganden bekannt, und die Frage, ob das Xenopus-Homologe des hGPR45, xPSP24, ein LPA-Rezeptor ist, wird kontrovers diskutiert (Marchese et al., 1999, Erickson et al., 1998). Es drängte sich aber dennoch die Frage auf, ob dieser neue Rezeptor ein Lipidrezeptor sein könnte.

Im Laufe dieser Arbeit wurde die identifizierte Sequenz (hGPR45like) unter der Bezeichnung hPSP24 β (Kawasawa et al., 2000a, Acc.No. AB030566) sowie als hGPR63 (Lee et al., 2001, Acc.No.No 030784) publiziert. Zudem konnten Kawasawa et al. (2000b) zeigen, dass weder hGPR45 (PSP24 α) noch hGPR63 (PSP24 β) Rezeptoren für LPA darstellen.

Die im Folgenden dargestellten Daten wurden mit Ausnahme der Sequenz, die zum Zeitpunkt der Patenteinreichung schon publiziert war, unter der Patentnummer DEAV 2002/1003 eingereicht.

Im Folgenden wird die Bezeichnung hGPR63 für die neue Sequenz sowie hGPR45 für den PSP24 α verwendet, um Verwechslungen auszuschließen.

3.2.1 Bioinformatische Grundlagen

Die bioinformatische Suche (durchgeführt von Herrn J. Gassenhuber) nach neuen LPA/S1P-Rezeptoren wurde mit der bereits publizierten Xenopus-Sequenz (AccNo. U76385), die für einen LPA-Rezeptor kodieren soll, in den bekannten Datenbanken durchgeführt. Hierbei wurden nur zwei GPCRs identifiziert: hGPR45 sowie der humane GPR63, letzterer war bisher nur als Vorhersage aus der genomischen DNA-Sequenz beschrieben worden. Zu diesem Zeitpunkt war das humane Genom schon zu ca. 80% durchsequenziert (5fach), so dass anzunehmen ist, dass zu dieser Familie – im Gegensatz zur LPA/S1P-Rezeptor Familie - nur diese beiden Mitglieder gehören. Die höchste Verwandtschaft zu bekannten Rezeptoren besteht zur Familie der Dopamin- und α -Adrenozeptoren (ca. 26%, Kawasawa et al., 2000b). Betrachtet man die Ähnlichkeit des hGPR63 und des hGPR45 zu den Lipidrezeptoren (S1P/LPA-Familie, OGR1, GPR4), fällt auf, dass hier nur eine Aminosäureidentität von unter 20% zu finden ist.

Der phylogenetische Baum (Abbildung 48) zeigt, dass die S1P/LPA-Familie innerhalb der Lipidrezeptoren am weitesten vom hGPR63 und hGPR45 entfernt ist, während andere Rezeptoren wie der OGR1 (mit dem später identifizierten Liganden SPC, Xu et al., 2000) oder

GPR4 (mit den später identifizierten Liganden SPC und Lysophosphatidylcholin (LPC); Zhu et al., 2001) einen höheren Verwandtschaftsgrad aufweisen.

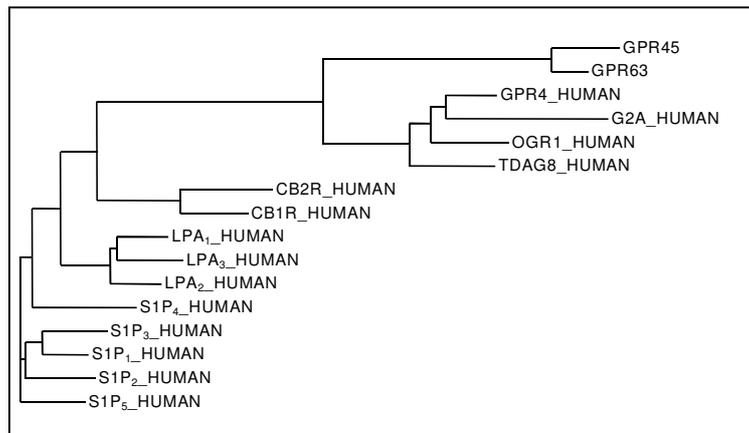


Abbildung 48: **Phylogenetischer Baum von hGPR45 und hGPR63 im Vergleich zu bekannten Lipidrezeptoren.** CBR: Cannabinoid-Rezeptor; TDAG8: T-cell death associated gene 8; OGR1: ovarian cancer GPCR.

3.2.1.1 Klonierung des hGPR63 aus genomischer DNA

Die identifizierte genomische Sequenz (die Aminosäure- und Proteinsequenz des hGPR63 ist im Anhang B, Seite 150 dargestellt) diene als Grundlage für die Klonierung des hGPR63 mittels PCR aus genomischer DNA. Das erhaltene PCR-Produkt (1263 bp, Abbildung 49) wurde mehrfach sequenziert.

Abbildung 49 zeigt, dass weder der hGPR45 noch der hGPR63 in gespleißter Form vorliegen und somit in dieser Hinsicht den S1P-Rezeptoren ähneln.

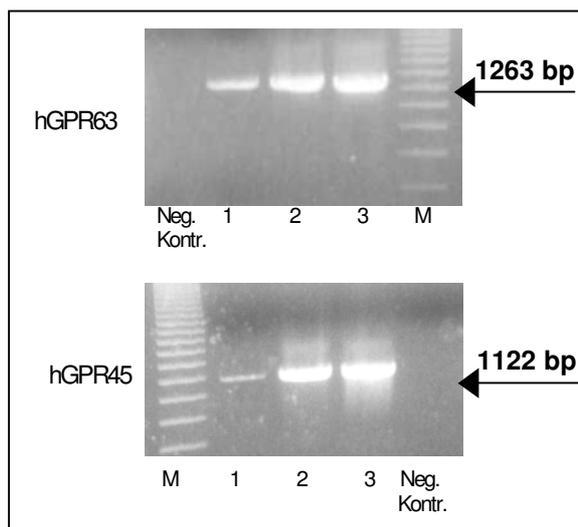


Abbildung 49: **Klonierung sowie PCR-Analyse des hGPR63 und hGPR45 in genomischer DNA.** Verschiedene Konzentrationen an genomischer DNA (1: 10 ng; 2: 25 ng; 3: 50 ng) wurden mit den Klonierungsprimern des hGPR63 und hGPR45 mittels PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. M: 200-bp-Marker; Neg. Kontr.: Negativ-Kontrolle.

3.2.2 Ligandenidentifizierung des hGPR63 und hGPR45

Trotz der relativ geringen Homologie zu den Lipidrezeptoren weisen einige Veröffentlichungen auf eine eventuelle Aktivierung des hGPR63 durch Lipide hin. Zudem wurde die Expression des homologen hGPR45 in Plättchen nachgewiesen (Motohashi et al., 2000), welche - wie in der Einleitung beschrieben - die wichtigste Quelle für S1P darstellen und maßgeblich an den Effekten der Lipide beteiligt sind. Somit liegt die Vermutung nahe, dass hier exprimierte Rezeptoren Lipidrezeptoren darstellen könnten.

3.2.2.1 **Bestimmung der Lipid-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung durch den hGPR63 und den hGPR45 mittels FLIPR-Technologie**

Um zunächst festzustellen, ob S1P eventuell einen Liganden für die *orphan*-Rezeptoren hGPR63 und hGPR45 darstellt, wurden beide Rezeptoren mit verschiedenen promiskuitiven G-Proteinen ($G\alpha_{16}$, $G\alpha_{q15}$, $G\alpha_{\Delta 6q14myr}$) in CHO-K1-Zellen kotransfiziert und die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ nach S1P Stimulation mit dem FLIPR gemessen. Während Kotransfektion mit $G\alpha_{16}$ und $G\alpha_{q15}$ keinen Hinweis auf eine Aktivierung der Rezeptoren durch S1P ergab (keine Abbildung), zeigte sich nach Kotransfektion mit $G\alpha_{\Delta 6q14myr}$ ein differenzierteres Bild. In Abbildung 50 (ein exemplarischer Versuch) wird deutlich, dass die S1P-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung in CHO-K1-Zellen nach Kotransfektion von hGPR63 und $G\alpha_{\Delta 6q14myr}$ deutlich höher lag als in Zellen, die nur mit dem G-Protein transfiziert worden sind. Im Gegensatz dazu bewirkte die Kotransfektion von $G\alpha_{\Delta 6q14myr}$ und hGPR45 eine deutliche Verringerung des freigesetzten Calciums. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt des hGPR45 nicht auf eine Wechselwirkung des Rezeptors mit S1P ohne anschließende Calciummobilisierung zurückzuführen sein könnte, wurde folgender Kontrollversuch durchgeführt: $G\alpha_{\Delta 6q14myr}$ wurde mit Rezeptoren, die nicht auf S1P reagieren (Urotensinrezeptor, Dopaminrezeptor), kotransfiziert und die hier durch S1P-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung im Vergleich zu den $G\alpha_{\Delta 6q14myr}$ -transfizierten Zellen bestimmt. Da sich in diesem Fall das gleiche Phänomen zeigte - Reduktion des freigesetzten $[Ca^{2+}]_i$ durch Kotransfektion eines GPCRs - (keine Abbildung), wurde die für den hGPR45 gemachte Beobachtung nicht weiter verfolgt.

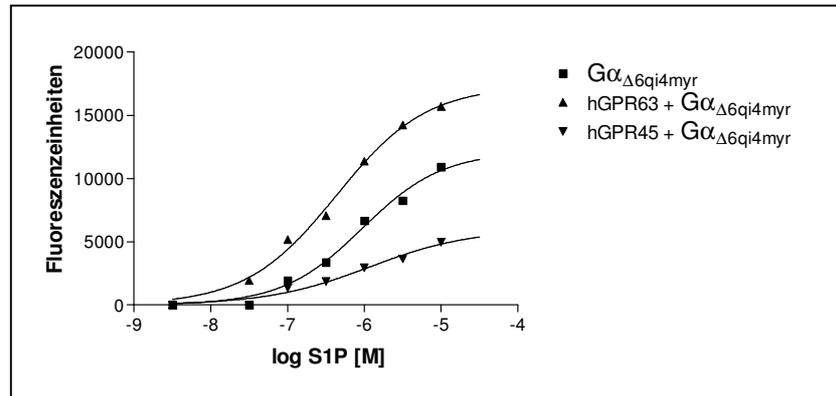


Abbildung 50: **S1P-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung in CHO-K1-Zellen nach transienter Transfektion von hGPR63, hGPR45 oder $G\alpha_{\Delta 6qi4myr}$.** CHO-K1-Zellen, die die angegebenen Plasmide transient exprimieren, wurden mit steigenden Konzentrationen an S1P stimuliert und die S1P-vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung wurde mit der FLIPR-Technologie bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Da alle bisher bekannten S1P-Rezeptoren auch auf dhS1P reagieren (Pyne & Pyne, 2000a; Lynch, 1999), lag die Vermutung nahe, dass auch der hGPR63 auf dieses Lipid reagieren könnte. Abbildung 51 zeigt die Dosiswirkungskurven für S1P (A) und dhS1P (B) in CHO-K1-Zellen, die den hGPR63 und $G\alpha_{\Delta 6qi4myr}$ oder $G\alpha_{\Delta 6qi4myr}$ alleine exprimieren.

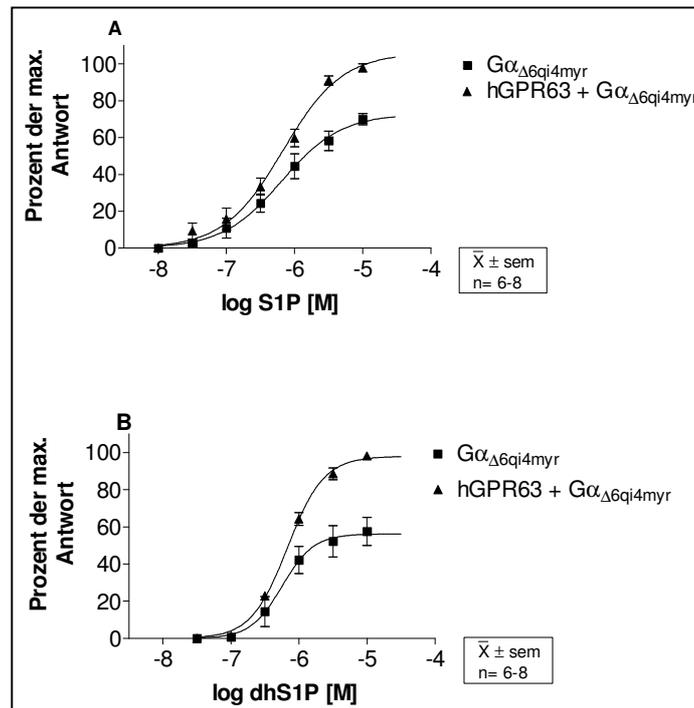


Abbildung 51: **Dosiswirkungskurve für S1P (A) und dhS1P (B) in den hGPR63-exprimierenden CHO-K1-Zellen.** CHO-K1-Zellen, die die angegebenen Plasmide transient exprimieren, wurden mit steigenden Konzentrationen an S1P (A) oder dhS1P (B) stimuliert und die Lipid-vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung wurde mit der FLIPR-Technologie bestimmt. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 6-8$

Ergebnisse

Mit einem EC_{50} -Wert von $6,84 \times 10^{-7}$ M für S1P und $6,78 \times 10^{-7}$ M für dhS1P lag die Affinität der beiden Lipide deutlich unter den für die S1P-Rezeptoren beobachteten (z.B. EC_{50} -Wert des $hS1P_5$ -Rezeptors = $1,7 \times 10^{-7}$ M) Werten und ermöglichte auch keine radioaktiven Bindungsversuche.

Um weitere potentielle Lipidliganden für hGPR63 und hGPR45 zu identifizieren, wurden die Lipide der Lipid-Substanz-Bibliothek an beiden Rezeptoren getestet. Hierfür wurden die Rezeptoren zusammen mit $G\alpha_{\Delta 6qj4myr}$ in CHO-K1-Zellen transfiziert und die durch die Lipide vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung mit der FLIPR-Technologie gemessen. Die Wahl des G-Proteins für den hGPR45 - $G\alpha_{\Delta 6qj4myr}$ - erfolgte in Anlehnung an das für den hGPR63 als ideal ermittelte G-Protein, da aufgrund des fehlenden Liganden keine Optimierung erfolgen konnte. Wie Abbildung 52 - hier sind exemplarisch die drei Substanz-Bibliothek-Platten für den hGPR63 dargestellt - deutlich zeigt, konnte weder für den hGPR63 noch für den hGPR45 ein weiteres Lipid als Ligand identifiziert werden.

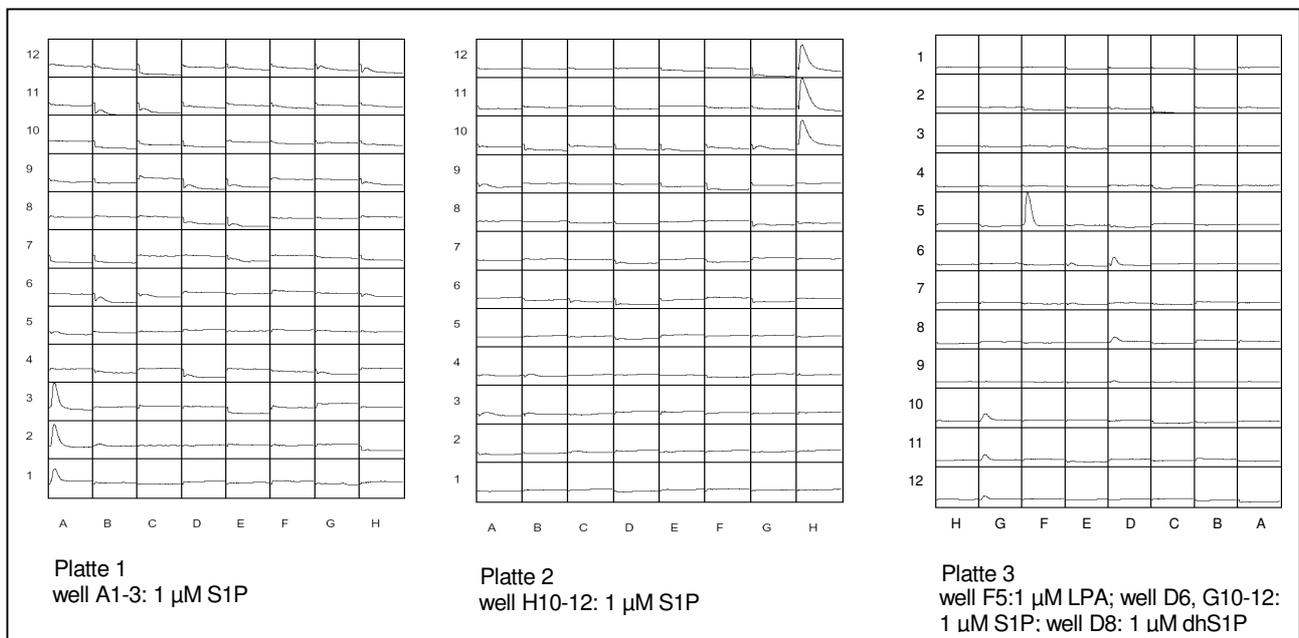


Abbildung 52: **Untersuchung von 201 bioaktiven Lipiden in CHO-K1-Zellen nach transienter Transfektion von hGPR63 und $G\alpha_{\Delta 6qj4myr}$.** CHO-K1-Zellen wurden transient mit dem hGPR63 und $G\alpha_{\Delta 6qj4myr}$ kotransfiziert und die jeweilige Lipid-induzierte Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ mit dem FLIPR gemessen.

Für die weiteren FLIPR-Messungen wurden die stabilen HEK293-Zelllinien des hGPR63 und des hGPR45 verwendet, da für einige der zusätzlich zur Substanz-Bibliothek getesteten Lipide Effekte in HEK293-Zellen beschrieben worden sind (Alderton et al., 2001). Da weder für den hGPR45 noch für den hGPR63 ein kommerzieller Antikörper existiert, der die Expression der Rezeptoren in den stabilen Zelllinien unter Beweis stellt, musste die funktionelle Charakterisierung der Zellen herangezogen werden. Diese wiederum war nur für den hGPR63 mit S1P möglich, da dem hGPR45 noch kein Ligand zugeordnet werden konnte. Hierfür

wurden die stabilen HEK293-Zellen zusätzlich mit $G\alpha_{\Delta 6qi4myr}$ transfiziert, da sich diese Kombination in CHO-K1-Zellen als ideal erwiesen hatte.

Abbildung 53 zeigt, dass die den hGPR63 stabil exprimierenden HEK293-Zellen nach Transfektion von $G\alpha_{\Delta 6qi4myr}$ eine deutlich höhere $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung zeigen als Zellen, die nur den Vektor und das G-Protein exprimieren.

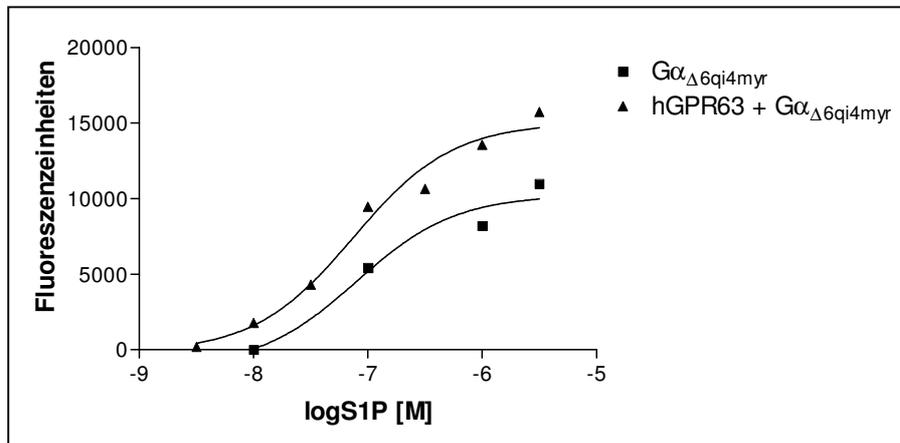


Abbildung 53: **S1P-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung in den hGPR63 oder Vektor stabil exprimierenden HEK293(PSC)-Zellen nach $G\alpha_{\Delta 6qi4myr}$ -Transfektion.** HEK293(PSC)-Zellen, die das entsprechende Plasmid stabil exprimieren (Vektor oder hGPR63), wurden transient mit $G\alpha_{\Delta 6qi4myr}$ transfiziert und mit steigenden Konzentrationen S1P stimuliert. $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung wurde mit der FLIPR-Technologie gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen.

Mit dieser Zelllinie sowie der stabilen Zelllinie des hGPR45 wurden einige Phosphatidsäure-Derivate (PA-Derivate) sowie Oleoylethanolamid (OEA) in einem funktionellen FLIPR-Versuch getestet. Für den hGPR45 konnten keine Liganden identifiziert werden (keine Abbildung), während sich für den hGPR63 das in Abbildung 54 dargestellte Bild zeigte: Neben dem als Ligand bekannten S1P, welches als Positivkontrolle diente, bewirkte auch Dioleoyl-PA (doPA) in hohen Konzentrationen (3-30 μ M, hier ist nur exemplarisch 30 μ M dargestellt, da sich hier der deutlichste Effekt zeigte) eine $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung, die im Gegensatz zu 0,01% PA deutlich höher lag als die in Vektor-exprimierenden Zellen gemessene.

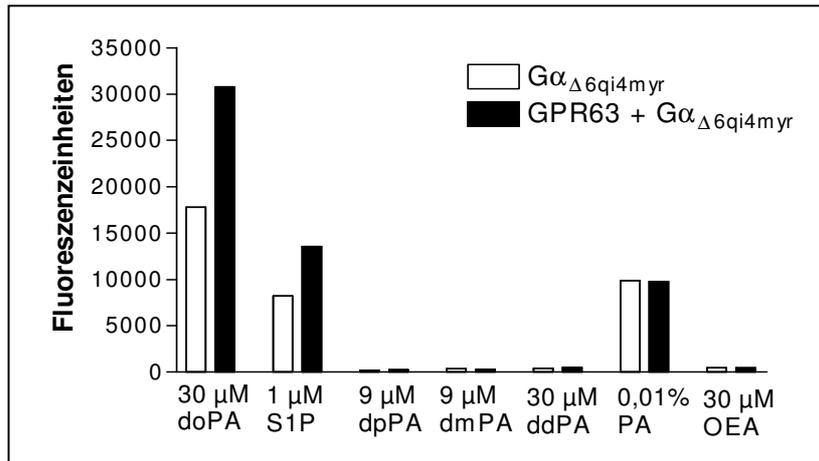


Abbildung 54: **Bestimmung der durch PA-Derivate- und OEA-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung in den stabilen hGPR63- oder Vektor-exprimierenden HEK293(PSC)-Zellen mittels FLIPR-Technologie.** Nach transienter Transfektion von $G\alpha_{\Delta 6qi4myr}$ wurden die stabilen HEK293(PSC)-Zellen (Vektor- oder hGPR63-exprimierend) mit dem entsprechenden Lipid stimuliert und die $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung bestimmt. PA: Phosphatidsäure; doPA: DioleoylPA; dpPA: DipalmitoylPA; dmPA: DimyristoylPA; ddPA: DidecanoylPA; OEA: Oleoylethanolamin. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Es sei darauf hingewiesen, dass die endogenen Hintergrundsignale für doPA in HEK293-Zellen manchmal eine eindeutige Aussage, dass doPA einen Liganden für den hGPR63 darstellt, unmöglich machten. Durch Mehrfachmessungen sowie durch die Messungen mittels Aequorin konnte jedoch die in Abbildung 56 gezeigte Aktivierung des hGPR63 bestätigt werden.

3.2.2.2 Bestimmung der Lipid-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung via hGPR63 in CHO-K1-Zellen mittels Aequorin

Zur Bestätigung der als Liganden für den hGPR63 im FLIPR identifizierten Lipide in einem Versuchssystem, das den natürlichen Signaltransduktionsweg ohne Verwendung eines promiskuitiven G-Proteins verwendet, wurde von S. Tunaru (Universität Heidelberg) die Lipid-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung mit der Aequorin-Technologie bestimmt. Diese erfasst aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit geringe Mengen an Ca^{2+} und kann somit auch die durch den $\beta\gamma$ -Komplex-vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung detektieren.

S1P wurde - als das Lipid mit der höchsten Potenz im FLIPR-System - verwendet, um die generelle Verwendbarkeit des Systems für diesen Rezeptor zu überprüfen. Mit einem EC_{50} -Wert von $0.80 \pm 0.11 \mu M$ (Abbildung 55, Vektor-transfizierte Zellen wiesen einen EC_{50} -Wert von $2.20 \pm 0.39 \mu M$ auf) waren die Werte mit denen des FLIPR-Versuchs vergleichbar, jedoch war der endogene Hintergrund hier deutlich geringer, so dass die Identifizierung niedrig potenter Lipide sich einfacher gestalten könnte. Auf eine Untersuchung von dhS1P wurde in diesem Zusammenhang verzichtet, da dieses Lipid im FLIPR-Versuch zu

S1P identische EC_{50} -Werte aufwies und eine erneute Untersuchung zu keinen weiteren Erkenntnissen geführt hätte.

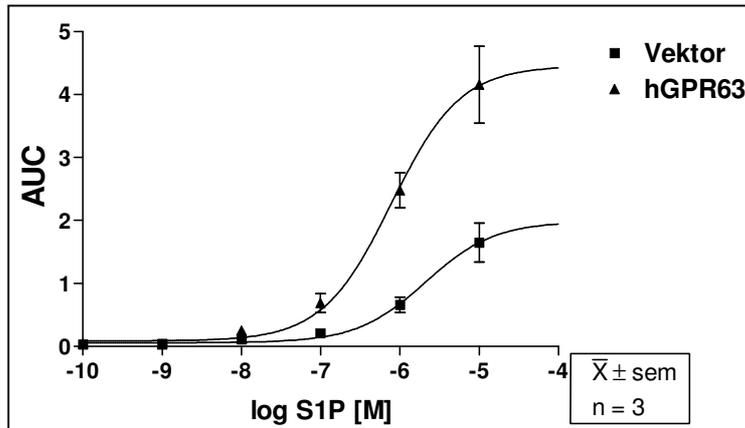


Abbildung 55: **Dosiswirkungskurve für S1P am hGPR63 in CHO-K1-Zellen, bestimmt mit der Aequorin-Technik.** CHO5A-Zellen wurden transient mit hGPR63 oder Vektor transfiziert und die $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen S1P, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 3$

Durch die niedrigeren Hintergrundsignale in diesem Versuchssystem - verglichen mit den FLIPR-Messungen mit $G\alpha_{\Delta 6qj4myr}$ -Kotransfektion - kann eine bessere Charakterisierung niedrig potenter Liganden erreicht werden. Abbildung 56 zeigt die in Dreifach-Bestimmung ermittelte dosisabhängige Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ in transient transfizierten (hGPR63 oder Vektor) CHO-K1-Zellen (EC_{50} (hGPR63) = $3.05 \pm 0.65 \mu M$, EC_{50} (Vektor-transfiziert) = $1.84 \pm 0.71 \mu M$) nach doPA-Stimulation. Während in niedrigen Konzentrationsbereichen kein signifikanter Unterschied zwischen Vektor- und hGPR63-exprimierenden Zellen nach der doPA-Stimulation zu erkennen war, zeigte sich in hohen Konzentrationen (ab $3 \mu M$) eine eindeutige Aktivierung des hGPR63 über die Hintergrundsignale hinaus.

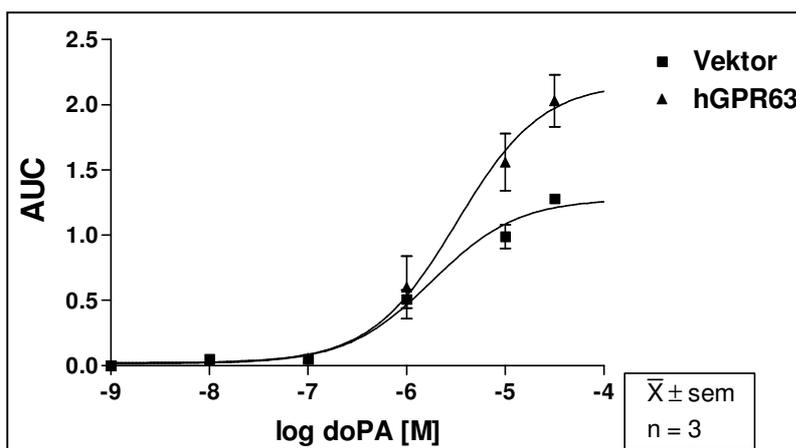


Abbildung 56: **Dosiswirkungskurve für doPA (Dioleoyl-Phosphatidsäure) am hGPR63 in CHO5A-Zellen, gemessen mit der Aequorin Technik.** CHO5A-Zellen wurden transient mit hGPR63 oder Vektor transfiziert und die $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen doPA, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 3$.

3.2.3 Expressionsprofile des hGPR63 und des hGPR45

Da wir zeigen konnten, dass der hGPR63 durch S1P aktiviert wird, wurde konsequenterweise nach der Ligandenidentifizierung ein Expressionsprofil des Rezeptors in humanen Herz-Kreislauf-relevanten Geweben und Zellarten erstellt. Der hGPR45, der aufgrund seiner hohen Homologie zum hGPR63 potentiell zu den Lipidrezeptoren gehört, wurde in den folgenden Untersuchungen weiter mit einbezogen.

Die Untersuchung der Expressionsprofile des hGPR63 sowie des hGPR45 in verschiedenen Geweben und Zellarten erfolgte mittels PCR. Eine Northern-Blot-Analyse war trotz intensiver Optimierungsarbeit in Bezug auf die Sonde sowie die Hybridisierungsbedingungen nicht durchführbar. Auch eine extern durchgeführte Untersuchung bei CBI (Commonwealth Biotechnologies Inc.) mit radioaktiv markierten, dort hergestellten Sonden ergab kein detektierbares Signal (Abbildung nicht gezeigt), was auf eine insgesamt sehr niedrige Expression der Rezeptoren hinweist. In den Untersuchungen von Kawaswa et al. (2000a) wurden 10 µg Poly A⁺-RNA der Maus eingesetzt, Marchese et al. (1999) verwendeten 10 µg humaner Poly A⁺-RNA, um die Lokalisation der hGPR45 in verschiedenen Hirnregionen sowie der Leber nachzuweisen; ein Einsatz dieser Mengen kam im Rahmen dieser Arbeit zur Expressionsanalyse eines Rezeptors in humanen Geweben aufgrund der hohen Kosten sowie der deutlich restriktiveren Handhabung humaner Genmaterialien nicht in Frage.

3.2.3.1.1 Expression des hGPR63 und hGPR45 in Herz-Kreislauf-relevanten Geweben sowie Hirn und Lunge

Die Expressionsuntersuchung in Herz-Kreislauf-relevanten Geweben sowie im Hirn als zentral regulierendem Organ und der Lunge als „neutralem Organ“ ist in Abbildung 57 (A) gezeigt. Der hGPR45 ist in Aorta, Herz, Ventrikel, fötalem Herz und Niere exprimiert, während im Atrium keine Bande zu detektieren war. Ein identisches Bild zeigte der hGPR63, mit der Ausnahme, dass eine schwache Bande im Atrium detektiert wurde. Beide Rezeptoren waren im Hirn vorhanden, in der Lunge wurden diese Rezeptoren nicht exprimiert (Abbildung 57 B).

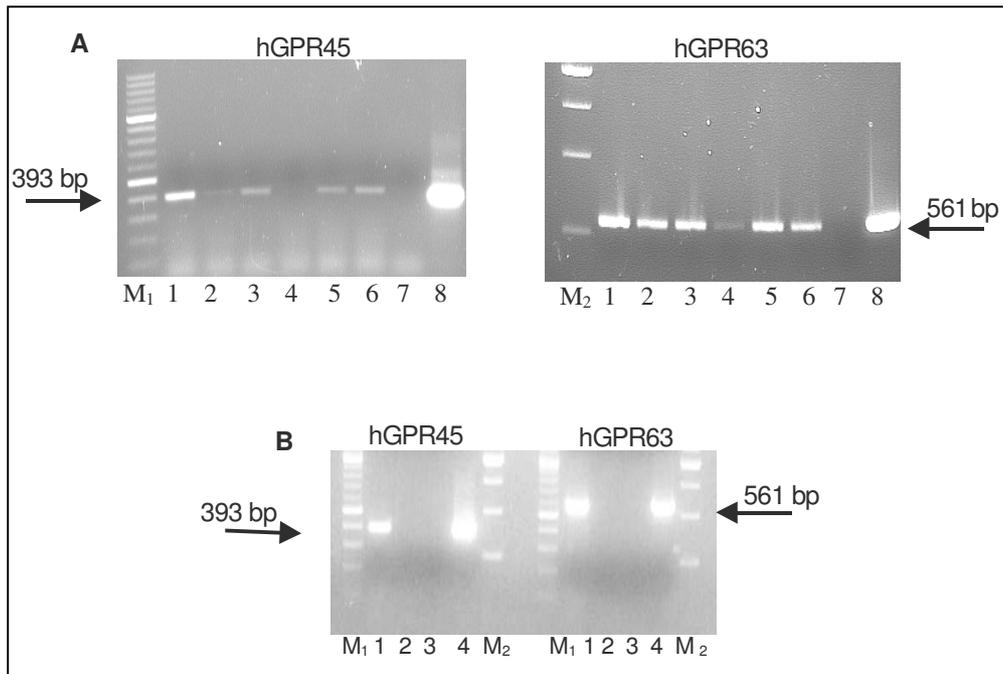


Abbildung 57: **Expressionsanalyse des hGPR45 und hGPR63 in kardiovaskulären Geweben (A) sowie in Hirn und Lunge (B).** cDNA der angegebenen Gewebe wurde mit für den jeweiligen Rezeptor spezifischen Primern amplifiziert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. **A:** M₁: 100-bp-Marker; 1: Aorta; 2: Herz; 3: Ventrikel; 4: Atrium; 5: fötales Herz; 6: Niere; 7: neg. Kontrolle; 8: Plasmid; M₂: 250-bp-Marker. **B:** M₁: 100-bp-Marker; 1: Hirn; 2: Lunge; 3: neg. Kontrolle; 4: Plasmid; M₂: 250-bp-Marker.

Inwiefern aus diesen Ergebnissen eine quantitative Aussage ableitbar ist, bleibt offen, da es sich um eine Endpunkt-PCR handelt. Expressionsuntersuchungen zum hGPR45 haben gezeigt, dass der Rezeptor in verschiedenen Hirnregionen sowie in der Leber exprimiert ist (Marchese et al., 1999). Andere Organe wurden in dieser Studie nicht untersucht. Für den hGPR63 existieren noch keine Expressionsdaten. Die von Kawasawa et al. (2000a) beschriebene hohe Expression des Ratten-Homologen im Hirn findet sich auch in unseren Untersuchungen des hGPR63 wieder. Die quantitative Untersuchung des hGPR63 mittels Echtzeit-PCR in verschiedenen Hirnregionen ist in Kapitel 3.2.3.3 beschrieben.

3.2.3.2 Expression in Endothelzellen, glatten Muskelzellen sowie HEK293-Zellen

Um eine differenzierte Betrachtung des Expressionsprofils zu erhalten, wurden im Anschluss an die Analyse verschiedener Organe noch die Zelltyp-spezifische Verteilung der Rezeptoren in Endothelzellen (Abbildung 58 B) sowie glatten Muskelzellen (Abbildung 58 A) und HEK293-Zellen (Abbildung 58 C) untersucht. Hierbei fällt auf, dass beide Rezeptoren in allen untersuchten Zelltypen exprimiert wurden. In den Endothelzellen der Koronararterie (Abbildung 58 B, Bande 1) erscheint die Expression jedoch deutlich stärker als in den anderen beiden Endothelzellarten, soweit man bei Einsatz identischer cDNA-Mengen in der Endpunkt-PCR eine quantitative Aussage treffen kann. Aufgrund der insgesamt schwachen Bandenintensität erscheint eine Analyse der Ergebnisse in diese Richtung jedoch möglich.

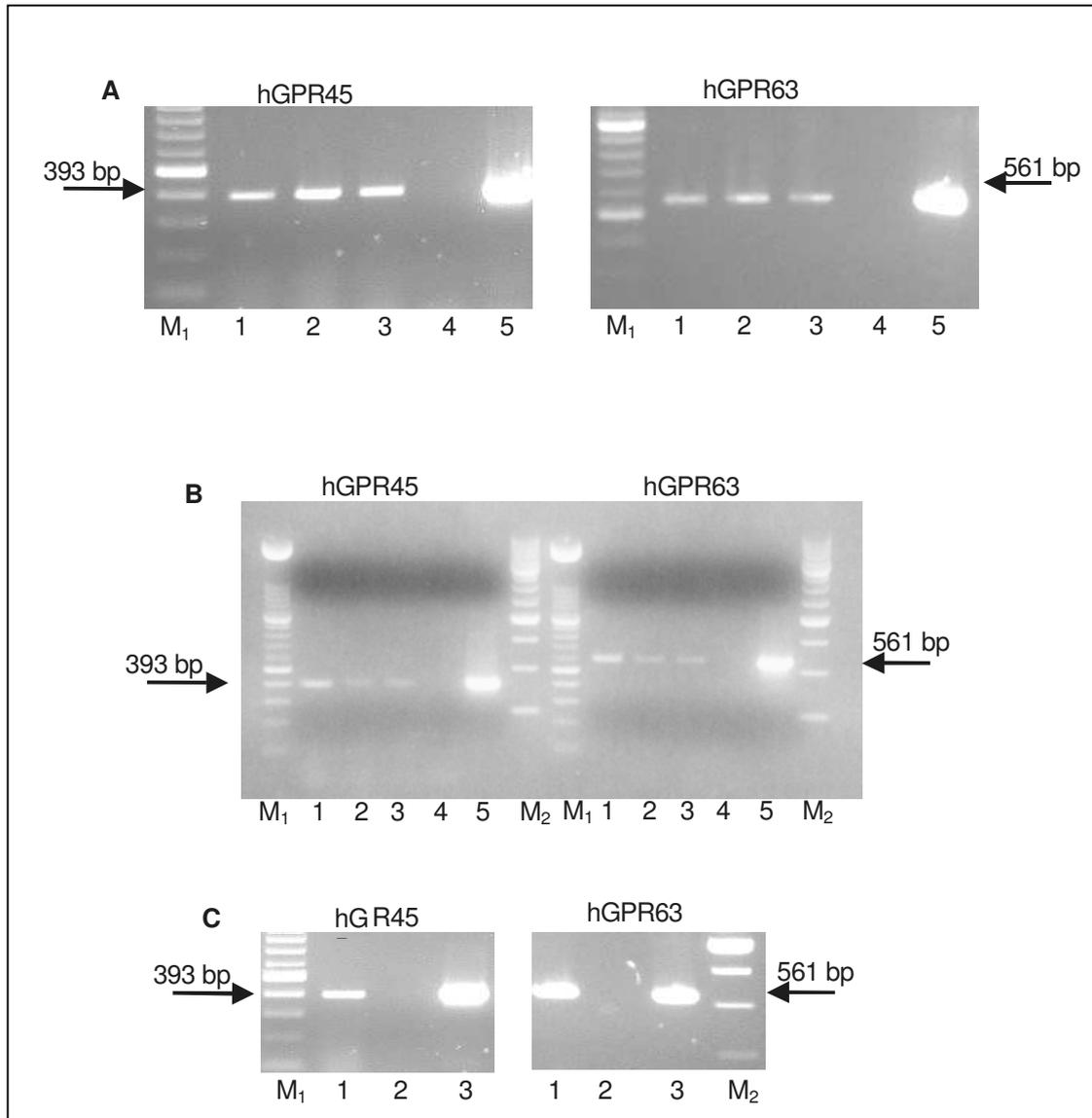


Abbildung 58: **Expressionsanalyse des hGPR45 und hGPR63 in glatten Muskelzellen (A), Endothelzellen (B) und HEK293-Zellen (C).** RNA der angegebenen Zellen wurde in cDNA umgeschrieben, mit für den jeweiligen Rezeptor spezifischen Primern amplifiziert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. **A:** M₁: 100-bp-Marker; 1: HCASMC, humane glatte Muskelzellen der Koronararterie; 2: HPASMC, humane glatte Muskelzellen der Pulmonararterie; 3: HAOSMC, humane glatte Muskelzellen der Aorta; 4: neg. Kontrolle; 5: Plasmid; M₂: 250-bp-Marker. **B:** M₁: 100-bp-Marker; 1: HCAEC, humane Endothelzellen der Koronararterie; 2: HMVEC-L, humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge; 3: HPAEC, humane Endothelzellen der Pulmonararterie; 4: neg. Kontrolle; 5: Plasmid; M₂: 250-bp-Marker. **C:** M₁: 100-bp-Marker; 1: HEK293-Zellen; 2: neg. Kontrolle; 3: Plasmid; M₂: 250-bp-Marker.

3.2.3.3 Quantitative Expressionsanalyse des hGPR63 in humanen Geweben sowie verschiedenen Hirnregionen mittels TaqMan

Eine quantitative Analyse der mittels konventioneller PCR generierten Expressionsdaten des hGPR63 wurde mittels TaqMan-PCR im Labor von Herrn A. Ardati (Aventis Pharmaceuticals, Bridgewater) durchgeführt. Abbildung 59 zeigt, dass im Verhältnis zur Expression im Hirn (diese wurde als höchste standardmäßig = 1 gesetzt) in Dünndarm, Magen und Thymus größere Mengen des Rezeptors exprimiert wurden, in Herz, Niere, Milz und Pankreas geringe Mengen zu finden waren und keine Expression in Leber, Lunge und Skelettmuskel auftrat.

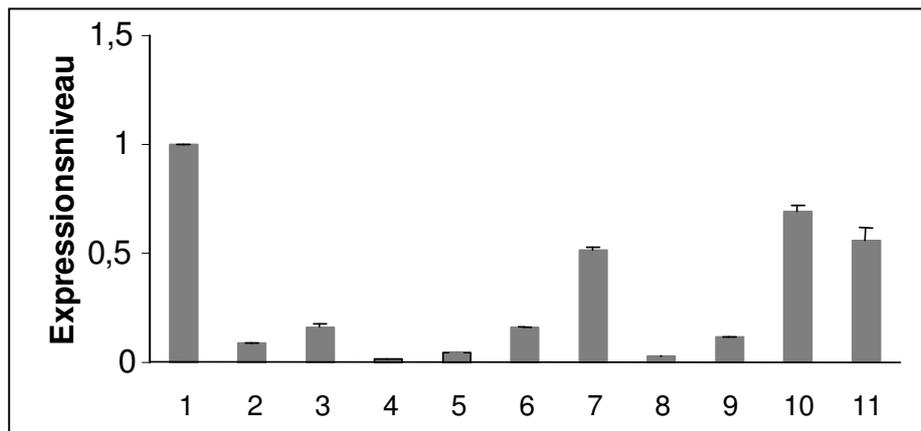


Abbildung 59: **Echtzeit-PCR von verschiedenen humanen Geweben mit einer TaqMan Sonde für den hGPR63.** 1: Hirn; 2: Herz; 3: Niere; 4: Leber; 5: Lunge; 6: Milz; 7: Thymus; 8: Skelettmuskel; 9: Pankreas; 10: Dünndarm; 11: Magen. Daten sind im Verhältnis zur Hirnexpression (= 1) angegeben.

Aufgrund der starken Expression im Hirn wurde im Anschluss eine weitere Charakterisierung der hGPR63-Expression in verschiedenen Hirnregionen durch Herrn Ali Ardati durchgeführt. Hierdurch könnten evtl. weitere Hinweise auf die physiologische Bedeutung des Rezeptors gewonnen werden. Abbildung 60 (hier wurde auf die Expression im Kleinhirn standardisiert) zeigt deutlich, dass insbesondere im Thalamus sowie im Nucleus caudatus hohe Expressionsniveaus des hGPR63 zu finden waren. Ersterer stellt die subkortikale Sammelstelle für die Sinnessysteme dar, während letzterer (Schweifkern) für die Weiterleitung dieser Reize zuständig ist. Zudem gehört der Nucleus caudatus zum extrapyramidalen System, welches u.a. für die Aufrechterhaltung des Muskeltonus zuständig ist. Die niedrige Expression im corpus callosum - dem „Balken“, der die beiden Hemisphären des Großhirns verbindet - lässt auf eine fehlende Funktion des hGPR63 bei der Weiterleitung der Reize zwischen diesen Bereichen schließen. Die Amygdala (Mandelkern) mit Funktionen im vegetativen Nervensystem wies ein mittleres Expressionsniveau auf.

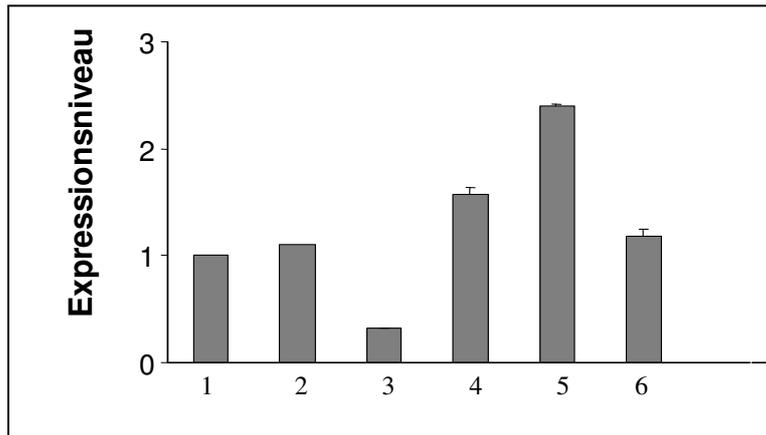


Abbildung 60: **Echtzeit-PCR von verschiedenen Hirnregionen mit einer TaqMan-Sonde für den hGPR63**
 1: Kleinhirn; 2: Hirn; 3: Corpus callosum; 4: Nucleus caudatus; 5: Thalamus; 6: Amygdala.
 Daten sind im Verhältnis zur Kleinhirnexression (= 1) angegeben. $\bar{x} \pm S.E.M.$; $n = 3$

3.2.4 Weitere Untersuchungen zu S1P-induzierten Effekten mit dem hGPR63

3.2.4.1 Effekte des hGPR63 auf die Zellproliferation

Die S1P-Effekte auf die Zellproliferation wurden schon in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Um zu eruieren, inwiefern auch der hGPR63 eine Rolle in diesem Bereich spielt, wurde der S1P-induzierte Effekt des Rezeptors auf die proliferativen Eigenschaften von CHO-K1-Zellen nach transienter Transfektion untersucht. Als Positivkontrolle wurde hier wieder der für seine antiproliferativen Effekte bekannte rS1P₅-Rezeptor in die Untersuchungen mit einbezogen.

Im Gegensatz zum rS1P₅-Rezeptor hatte der hGPR63 nach Inkubation mit 1 μ M S1P in csFCS-haltigem Medium einen deutlichen stimulatorischen Effekt auf die Proliferation in CHO-K1-Zellen (Abbildung 61). Dieser war nicht so ausgeprägt wie nach Zugabe von 10% normalem Serum zum Medium, jedoch statistisch signifikant in mehreren Versuchen nachweisbar. In HEK293-Zellen wurden identische Versuche durchgeführt, die zum gleichen Ergebnis führten (keine Abbildung).

Ergebnisse

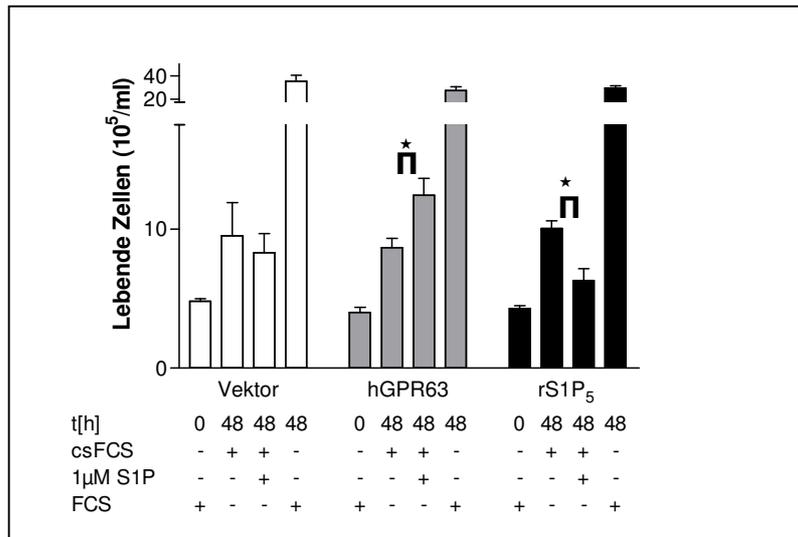


Abbildung 61: **S1P-vermittelte Effekte des hGPR63 und rS1P₅-Rezeptors auf die Zellproliferation in CHO-K1-Zellen.** CHO-K1-Zellen wurden transient mit dem angegebenen Plasmid transfiziert. 16 h nach der Transfektion ($t = 0$) wurden die Zellen für weitere 48 h im angegebenen Medium kultiviert. Die lebenden Zellen wurden im Zellzähler bei $t = 0$ und $t = 48$ h bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 4-6 Kulturschälchen \pm S.E.M. eines repräsentativen Experiments.

Um zu testen, ob die Wachstumsstimulation $G\alpha_i$ vermittelt ist, wurden die Versuche in Gegenwart von PTX durchgeführt.

Es ließ sich keine Hemmung der Wachstumsstimulation durch hGPR63 nach S1P-Stimulation feststellen (Abbildung 62), was auf das Mitwirken eines anderen Signaltransduktionsweges hinweist.

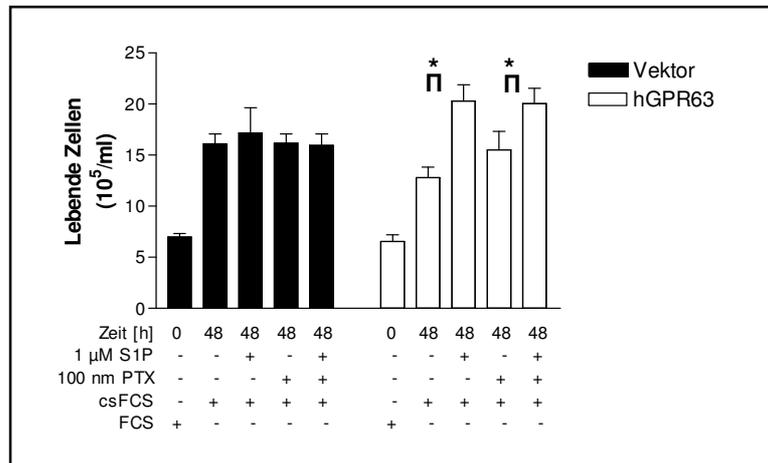


Abbildung 62: **S1P-vermittelte Effekte des GPR63 und rS1P₅-Rezeptors auf die Zellproliferation in CHO-K1-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von Pertussitoxin (PTX).** CHO-K1-Zellen wurden transient mit den angegebenen Plasmid transfiziert. 16 h nach der Transfektion ($t = 0$) wurden die Zellen für weitere 48 h im angegebenen Medium (mit oder ohne 100 nM PTX) kultiviert. Die lebenden Zellen wurden im Zellzähler bei $t = 0$ und $t = 48$ h bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 4-6 Kulturschälchen \pm S.E.M. eines repräsentativen Experiments.

3.2.4.2 cAMP-, GTP γ S-, Rho-Aktivierungsversuche

Alle weiteren Untersuchungen des hGPR63 und des hGPR45 wurden mit den jeweiligen stabilen Zelllinien der beiden Rezeptoren durchgeführt. Die Existenz aller essentieller G-Protein-Untereinheiten wurde mittels Western Blot (siehe 2.2.3.5) sowie die Funktionalität der hGPR63-exprimierenden Zellen im FLIPR-Versuch nachgewiesen. Dennoch konnte, wie in Tabelle 27 gezeigt, weder im cAMP-Versuch, noch im GTP γ S-Bindungsversuch oder im Rho-Aktivierungsversuch eine Aktivierung des jeweiligen Signaltransduktionsweges durch S1P in diesen Zellen gezeigt werden. Auch die S1P-induzierte Rezeptorinternalisierung mit Hilfe eines hGPR63-GFP-Konstruktes konnte nicht gemessen werden, da die Expression des Konstruktes so gut wie nicht vorhanden war (keine Abbildung). Vergleichend sind der hS1P₅-Rezeptor und der NT-Rezeptor mit aufgeführt.

Tabelle 27: Aktivierung verschiedener Versuchssysteme durch S1P-Stimulation in den hGPR63, den hGPR45, den hS1P₅-Rezeptor oder den NT-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen. - = Kein Effekt; + = Aktivierung[↑] oder Hemmung[↓]; n.u. = nicht untersucht.

Rezeptor Versuch	hGPR63	hGPR45	hS1P ₅	hNT
cAMP	-	-	+ [↓]	n.u.
GTP γ S	-	-	+	n.u.
Rho	-	-	-	+ [↑]
Internalisierung (GFP-Konstrukt)	-	n.u.	+	n.u.

4 Diskussion

Die Diskussion teilt sich in zwei Abschnitte: Der erste beschäftigt sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen der Rezeptoren S1P₅ und hGPR63. Hierbei wird zunächst auf die Bedeutung des hS1P₅-Rezeptors als S1P-Rezeptor sowie auf die Unterschiede zwischen dem humanen und Ratten-S1P₅-Rezeptor eingegangen. Danach werden die Untersuchungen am hGPR63 erläutert. Im zweiten Teil schließt sich die Diskussion der Bedeutung der konstitutiven und regulierten Aktivität des S1P₅-Rezeptors und der hier involvierten Signaltransduktionswege an.

4.1 ***Der humane S1P₅-Rezeptor und der humane GPR63: zwei neue S1P-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität.***

4.1.1 Der fünfte hochaffine humane S1P-Rezeptor

Es wurde schon seit längerem vermutet, dass S1P und LPA ihre Effekte teilweise über GPCRs vermitteln. Betrachtet man die Fülle an Wirkungen, die diese Lipide in Zellen und Geweben zu vermitteln in der Lage sind, ist es nicht erstaunlich, dass mehrere Rezeptor-Subtypen für beide Lipide existieren. Um die Bedeutung der Lipide besser verstehen zu können, ist es unabdingbar, alle Rezeptoren zu kennen und zu charakterisieren, die in die Vermittlung der S1P- und LPA-Effekte involviert sind. Nachdem der erste LPA-Rezeptor 1996 und der erste S1P-Rezeptor 1998 identifiziert worden sind (Lee et al., 1998a), kamen in kurzem Abstand neue Familienmitglieder von unterschiedlichen Spezies hinzu (Xenopus, Zebrafisch, Maus, Ratte und Mensch), so dass man zu Beginn dieser Arbeit drei hochaffine humane LPA-Rezeptoren sowie vier hochaffine humane S1P-Rezeptoren kannte. Ein fünftes potentiell Mitglied der S1P-Familie konnte 1999 aus Phäochromozytomzellen der Ratte kloniert werden (nrg-1, Glickman et al., 1999; heute als rS1P₅-Rezeptor bezeichnet). Parallel zu unseren Untersuchungen wurde die Vermutung, dass es sich hierbei um einen S1P-Rezeptor handelt, von Im et al. (2000) bestätigt. Unser Ziel war es daher, zunächst das humane Homologe des rS1P₅-Rezeptors zu identifizieren, zu klonieren und schließlich zu charakterisieren. Hierbei stießen wir auf den auch von Im et al. (2000) erwähnten 100.000 bp umfassenden genomischen Klon, in dem sich eine putative Sequenz des humanen Rezeptors verbarg. Zur Lokalisation dieser Sequenz wurde ein bioinformatischer Suchvorgang mit allen bekannten LPA/S1P-Rezeptoren gestartet. Nur der rS1P₅-Rezeptor wurde absichtlich nicht mit eingeschlossen, um die angewandte Suchstrategie für spätere Fragestellungen zu validieren. Dieser Ansatz führte zur Identifizierung eines humanen genomischen Klons mit 86%iger Identität zum rS1P₅-Rezeptor (Sequenzvergleich der bekannten S1P₅-Rezeptoren verschiedener Spezies siehe Anhang A, Seite 149) und ca. 40-50%iger Homologie zu den bekannten humanen S1P-Rezeptoren. Hiermit konnten wir parallel zur Identifizierung des neuen humanen putativen S1P-Rezeptors zeigen, dass die gewählte Strategie, einen

Suchvorgang im humanen Genom mit den bekannten Familienmitgliedern zu starten, ein valides Werkzeug zur Identifizierung neuer Familienmitglieder darstellt. Diese können dann – wie auch der hS1P₅-Rezeptor - leicht aus genomischer DNA kloniert werden, da die meisten GPCRs die kodierende Region in einem Exon tragen. Zusätzlich kann dadurch die Gefahr ausgeschlossen werden, gewebespezifische Splicevarianten, die häufig unterschiedliche Funktionen wahrnehmen, zu klonieren.

Die Strategie zur Identifizierung des Liganden für den neuen *orphan*-Rezeptor setzte sich aus zwei der möglichen Ansätze zusammen: Erstens lässt die hohe Homologie zu den bekannten S1P-Rezeptoren vermuten, dass es sich bei dem identifizierten Klon auch um einen Rezeptor für diesen Liganden handeln könnte, und zweitens konnte der Rezeptor in allen untersuchten Endothelzellen, in denen viele Effekte von S1P beobachtet worden sind (Panetti et al., 2002), nachgewiesen werden. Daher wurde nach transienter Transfektion des Rezeptors in CHO-K1-Zellen die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit S1P getestet. Da die S1P-Rezeptoren ubiquitär vorhanden sind und es somit bis heute keine Säugerzelllinie gibt, die nicht endogen auf S1P reagiert, wurden CHO-K1-Zellen gewählt. Diese sind dafür bekannt, in dem gewählten Versuchssystem niedrige endogene Signale zu produzieren, allerdings nach Transfektion von S1P_{1,2} und ₃ messbare Signale zu ergeben (Okamoto et al., 1998, Kon et al., 1999). Methodisch haben wir uns für die Messung der Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ aus drei Gründen entschieden:

- 1) Es ist bekannt, dass S1P die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ in vielen Zelltypen bewirkt (Zhang et al., 1991; Durieux et al., 1993; Chao et al., 1994; Gosh et al., 1994; Meyer zu Heringdorf et al., 1996; van Koppen et al., 1996; Yatomi et al., 1997b; An et al., 1999),
- 2) die Identifizierung der Rezeptoren S1P₁₋₄ hat die molekulare Basis für diesen GPCR-vermittelten Effekt bereitgestellt, und es ist bekannt, dass diese Rezeptoren die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ entweder PTX-sensitiv über $G\alpha_i$ oder PTX-insensitiv über $G\alpha_{q/11}$ (Okamoto et al., 1998; Kon et al., 1999; Gonda et al., 1999) vermitteln,
- 3) alle bisher bekannten S1P-Rezeptoren (außer dem S1P₄-Rezeptor) kommen in Endothelzellen vor, in denen die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ den Hauptweg zur Freisetzung von NO, einem der wichtigsten Vasodilatoren, darstellt.

Nachdem die Transfektion des neuen *orphan*-GPCRs alleine keinen S1P-vermittelten Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$ bewirken konnte (dies wurde auch für alle anderen S1P-Rezeptoren, mit Ausnahme des S1P₃ beobachtet), wurden verschiedene promiskuitive G-Proteine zusammen mit dem Rezeptor in CHO-K1-Zellen transfiziert. Sowohl mit $G\alpha_{16}$, welches GPCRs verschiedener funktioneller Klassen an den $G\alpha_q$ -PLC β -Signaltransduktionsweg koppelt, als auch mit den Chimären $G_{\alpha\Delta 6q/4myr}$ und $G_{\alpha_{q/5}}$, welche $G\alpha_i$ gekoppelten Rezeptoren die Fähigkeit verleihen, $G\alpha_q$ zu stimulieren (Conklin et al., 1993, Kostenis, 2002), konnte der Rezeptor nach S1P-Stimulation $[Ca^{2+}]_i$ freisetzen. Hiermit konnten wir durch das *deorphaning* eines *orphan*-GPCRs den fünften

humanen S1P-Rezeptor, hS1P₅, identifizieren. Gleichzeitig lieferte die Tatsache, dass zur Mobilisierung von im FLIPR-System messbarem [Ca²⁺]_i über den hS1P₅-Rezeptor die Kotransfektion eines G-Proteins (hier erwies sich Gα_{q15} als optimal) erforderlich war, einen Hinweis auf die von diesem Rezeptor genutzten Signaltransduktionswege. Daraus lässt sich schließen, dass der native Signaltransduktionsweg des hS1P₅-Rezeptors, der zur Freisetzung von [Ca²⁺]_i führt, nicht der Gα_q-Weg, sondern voraussichtlich die Aktivierung von PLCβ durch die β/γ-Untereinheiten nach Gα_i-Aktivierung ist. Diese Vermutung konnte später durch die PTX-Sensitivität der im Aequorin- sowie im GTPγS-Versuch erhaltenen S1P₅-vermittelten S1P-Signale bestätigt werden. Die Verwendung von promiskuitiven G-Proteinen kann also nicht nur zur Identifizierung neuer Liganden an *orphan*-Rezeptoren beitragen sondern auch zur weiteren Charakterisierung der Rezeptoren. Zudem können hierdurch wertvolle Hinweise auf die zu erwartenden zellulären Effekte der Rezeptoren gewonnen werden. Unsere Beobachtung, dass die Lipide S1P und das reduzierte dhS1P, welches getestet wurde im Anschluss an die Identifizierung des hS1P₅-Rezeptor als S1P-Rezeptor, vergleichbare Wirkungen am hS1P₅-Rezeptor zeigen, war nicht überraschend. Alle bisher identifizierten S1P-Rezeptoren weisen keinen (S1P₁) oder nur einen geringen Unterschied (S1P₂ und ₃) bezüglich ihrer Affinität zu den beiden Lipiden auf (siehe auch Im et al., 2001).

Die kardiovaskulären Wirkungen von S1P und LPA sind mehrfach beschrieben worden, eine Zuordnung zu bestimmten Rezeptoren konnte bis jetzt jedoch nicht erfolgen (Sugiyama et al., 2000; Karliner, 2002). Die Identifizierung eines weiteren potentiellen Mitgliedes dieser Familie war nicht vorhersehbar, da die bekannten Effekte mit den bisher identifizierten Rezeptoren schon zu erklären waren. Die Entdeckung des fünften S1P-Rezeptors kompliziert somit das ohnehin umfangreiche Gebiet der Lipide und ihrer Rezeptoren zusätzlich. Um eine bessere Zuordnung der kardiovaskulären Effekte zu einzelnen Rezeptorsubtypen vornehmen zu können, erscheint die Bestimmung des Expressionsprofils aller LPA/S1P-Rezeptoren in Herz-Kreislauf-relevanten Geweben ein wichtiger Baustein zu sein. Eine vergleichbare familienübergreifende Analyse ist noch nicht in der Literatur zu finden. Wie Abbildung 21 (Seite 74) zeigt, erschwert die stark überlappende Gewebeverteilung aller untersuchten Rezeptoren (nur der LPA₂- und der S1P₄-Rezeptor konnten nicht im Herzen und der Niere nachgewiesen werden) eine Eingrenzung der für die kardiovaskulären Effekte der Lipide jeweils verantwortlichen Rezeptoren. Für die S1P₁₋₃-Rezeptoren wurde von Mazurais et al. (2002) in Northern-Blot-Untersuchungen die Verteilung der Rezeptoren in den kardialen Geweben bestätigt. Es bleibt aufgrund der überlappenden Expression der Rezeptoren in den einzelnen Geweben jedoch die Notwendigkeit bestehen, die Expression der Rezeptoren in speziellen Zellarten zu überprüfen, spezifische Agonisten, Antagonisten, inverse Agonisten oder allosterische Modulatoren zu entwickeln sowie die jeweiligen Signaltransduktionswege aller Rezeptoren zu untersuchen.

Motohashi et al. (2000) konnten zeigen, dass mit Ausnahme des S1P₄-Rezeptors kein S1P-Rezeptor in Plättchen exprimiert ist, während alle LPA-Rezeptoren hier nachweisbar

waren. Demgegenüber konnten unsere Untersuchungen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen – Zelltypen, die eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Ereignissen spielen können – zeigen, dass insbesondere die Rezeptoren S1P_{1,2,3} und 5 in Endothelzellen zu finden (siehe Abbildung 22, Seite 76) sind. Expressionsdaten in HUVECs wurden für die Rezeptoren S1P_{1,2} und 3 sowie LPA₁ und 2 mehrfach beschrieben (Wang et al., 1999a; Kimura et al., 2000; Lee et al., 2000). Im Gegensatz zu Lee et al. (2000) konnten wir den LPA₁-Rezeptor nicht in HUVECS oder den anderen untersuchten Endothelzellen nachweisen, während der S1P₂-Rezeptor in unseren Untersuchungen eine deutliche Expression aufwies. Warum wir den LPA₁-Rezeptor nicht nachweisen konnten, ist unklar, für den S1P₂-Rezeptor sind die Expressionsdaten in der Literatur widersprüchlich (Lee et al., 1999b, Wang et al., 1999). Mazurais et al. (2002) untersuchten vor kurzem die Expression der Rezeptoren S1P₁₋₃ in verschiedenen kardialen Endothelzellen und konnten hier nur den S1P₁-Rezeptor nachweisen. Wie von der Gruppe selbst festgestellt, kann es jedoch bei der von ihnen gewählten Methode (in-situ-Hybridisierung = ISH) bei niedriger Expression des untersuchten Transkripts dazu kommen, dass dieses nicht detektiert wird. RT-PCR-Methoden (auch von Hla & Maciag 1990 bei der Identifizierung des S1P₁-Rezeptors eingesetzt), die in dieser Arbeit genutzt wurden, sind hier deutlich sensitiver. Dieser methodische Unterschied könnte für die Diskrepanz der Ergebnisse verantwortlich sein. Die weit verbreitete Expression insbesondere der S1P-Rezeptoren in Endothelzellen, aber auch des LPA₂-Rezeptors und, wie von Lee et al. (2000) gezeigt, evtl. auch des LPA₁-Rezeptors zeigen deutlich, dass die Lipide S1P und LPA eine wichtige Rolle in der Funktion des Endothels spielen. Da die untersuchten Effekte der beiden Lipide auf Endothelzellen und die damit verbundene Bedeutung in der Pathogenese der Atherosklerose ein komplexes Bild ergeben (einen Überblick gibt Panetti, 2002), welches Induktion und Hemmung von Atherogenese, Stimulation der NO-Produktion und das Anlocken von Zelladhäsionsmolekülen zu den Plaques beinhaltet, sind hier noch weitere Untersuchungen nötig. Die Antwort auf die Frage, welcher Rezeptor für welchen der zum Teil entgegengesetzten Effekte verantwortlich ist, könnte hier sehr hilfreich sein.

oxLDL scheint eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zu spielen, in dem es u.a. die Proliferation glatter Muskelzellen in atherosklerotischen Läsionen induziert. Siess et al. (1999) konnten zeigen, dass LPA eine der aktiven Komponenten im oxidierten *low density lipoprotein* (oxLDL) darstellt. In einer Untersuchung von Auge et al. (1999) wurde zudem gezeigt, dass es durch oxLDL zur Bildung von S1P durch Aktivierung der SPHK kommen kann. Es ist daher zu vermuten, dass die LPA/S1P-Rezeptoren an den Effekten des oxLDL beteiligt sein könnten. Durch Identifizierung der potentiell involvierten Rezeptoren könnte ein weiterer Schritt für das Verständnis der Atherosklerose geleistet werden. Ein weiterer Aspekt, die Rezeptorverteilung in glatten Muskelzellen zu untersuchen, ist die Beobachtung von Nakajima et al. (2000), dass S1P in Kardiomyozyten zum erhöhten Calciumstrom in die Zellen führen kann und damit die kardialen Funktionen aus dem Gleichgewicht bringt. Wie wir

in unseren Untersuchungen (Abbildung 22, Seite 76) als erste Arbeitsgruppe zeigen konnten, ist auch hier die Identifizierung des potentiell für diese Effekte verantwortlichen Rezeptors durch die überlappende Expression aller LPA/S1P-Rezeptoren außer den LPA₂- und S1P₄-Rezeptoren in den untersuchten glatten Muskelzellen zur Zeit noch unmöglich. Mazurais et al. (2002) konnten den S1P₁-Rezeptor - wie in unseren Untersuchungen auch gezeigt - nicht in glatten Muskelzellen der Aorta nachweisen. Arbeiten von Rakhit et al. (2001) unterstützen unsere Befunde, dass der Rezeptor dennoch in bestimmten glatten Muskelzellen, nämlich denen der Lunge, vorkommt. Auch die vasokonstriktorischen Effekte von S1P und LPA könnten eine Rolle in glatten Muskelzellen spielen. Erste Arbeiten von Coussin et al. (2002) auf diesem Gebiet weisen auf vasokonstriktorische Wirkungen von S1P hin, weiterführende Untersuchungen werden hier Genaueres zeigen.

Wie bei allen Expressionsstudien ist die Bestimmung des RNA-Expressionsniveaus ein Hinweis auf die Bedeutung der Rezeptoren. Die Untersuchung der Expression auf Proteinebene mittels Western Blot gibt jedoch erst Aufschluss darüber, ob der Rezeptor auch tatsächlich exprimiert wird.

Es gibt in der Literatur mehrere Beispiele von Rezeptoren, die von mehr als einem Liganden erregt werden. Zhu et al. (2001) konnten zeigen, dass der *orphan*-Rezeptor GPR4 sowohl auf SPC als auch auf LPC reagiert, während der GPR68 (auch als Ovarialkarzinom-GPCR, „OGR1“ bezeichnet) ausschließlich auf SPC anspricht (Xu et al., 2000). Die CRF-Rezeptorfamilie ist ein weiteres Beispiel für GPCRs, die von einer Fülle an Liganden stimuliert werden (Dautzenberg et al., 2002; Lewis et al., 2001).

Da es sich bei dem neuen S1P₅-Rezeptor um einen S1P-Rezeptor handelt und dessen Charakterisierung insbesondere im Hinblick auf kardiovaskuläre Effekte erfolgen sollte, wurden bei der Suche nach spezifischen, hochaffinen Liganden für die LPA/S1P-Rezeptoren nur noch die humanen S1P-Rezeptoren S1P_{1,2,3 und 5} untersucht. Um einen Querschnitt durch möglichst viele der bekannten Lipidstrukturen zu gewährleisten, wurde eine Substanz-Bibliothek mit bioaktiven Lipiden getestet, in der sowohl Lipide mit struktureller Ähnlichkeit zu S1P als auch Lipide mit einer komplett anderen Struktur enthalten sind (siehe Anhang C, Seite 151). Der Konzentrationsbereich der Lipide (100 nM – 1 µM) wurde entsprechend den physiologisch relevanten Bereichen gewählt. Es konnte jedoch an keinem der humanen Rezeptoren ein neues Lipid als Ligand identifiziert werden (siehe Abbildung 27, Seite 82). Dass wir Sphingosylphosphorylcholin (SPC) im Gegensatz zu einigen anderen Arbeitsgruppen (Ancellin und Hla, 1999; Gonda et al., 1999; Okamoto et al., 1999) bei keinem der Rezeptoren als Ligand identifizieren konnten, ist wahrscheinlich hauptsächlich auf die niedrige Konzentration des SPCs sowie das gewählte Versuchs- und Zellsystem zurückzuführen. Ancellin und Hla (1999) konnten SPC-induzierte Freisetzung von [Ca²⁺]_i in transient mit den jeweiligen Rezeptoren transfizierten Oozyten messen, die EC₅₀-Werte lagen hier jedoch im mikromolaren Bereich; bei 1 µM wurde nahezu keine Aktivierung der Rezeptoren durch SPC beobachtet. Niedrigere

EC₅₀-Werte (~ 500 nM) wurden in stabilen Zelllinien der verschiedenen Rezeptoren gemessen (Gonda et al., 1999; Okamoto et al., 1999), während van Brocklyn et al. (1998) in transient transfizierten HEK-Zellen keine SPC-Wirkungen an den Rezeptoren S1P₁₋₃ beobachten konnten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass wir im Rahmen der Untersuchungen mit der Lipid-Substanz-Bibliothek niedrig potente Liganden für die vier untersuchten S1P-Rezeptoren nicht identifizieren konnten, da die eingesetzten Konzentrationsbereiche der Lipide von 100 nM bis 1 µM reichten. Unser Ziel war jedoch die Identifizierung potenter, physiologisch relevanter Liganden. Die Tatsache, dass keines der Lipide neben S1P und dhS1P eine Wirkung an den humanen S1P-Rezeptoren zeigte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass es für diese Rezeptoren keine weiteren hochaffinen natürlichen Liganden gibt.

Im et al. (2001) identifizierten dem S1P strukturell sehr ähnliche Analoge – die chirale 3-Hydroxy-Funktion des S1P wurde durch ein Amid oder eine Carbonylgruppe ersetzt – die in der Lage sind, GTPγS-Bindung an Membranen von den hS1P₅-Rezeptor exprimierenden Zellen zu induzieren, wenngleich mit niedrigerer Potenz als S1P. Es bleibt zu überprüfen, ob sich auch in weiteren funktionellen *second-messenger*-Versuchen oder *in vivo* die Wirksamkeit der Substanzen reproduzieren lässt.

Während des Verfassens dieser Arbeit wurde von zwei Arbeitsgruppen (Mandala et al., 2002; Brinkmann et al., 2002) ein neuer hochaffiner, jedoch nicht receptorspezifischer Ligand für alle S1P-Rezeptoren mit Ausnahme des S1P₂-Rezeptors identifiziert. Es handelt sich hierbei um die phosphorylierte Form des als Immunsuppressivum bekannten FTY720. FTY720 ähnelt strukturell dem Sphingosin und die phosphorylierte Form (FTY720P) wird *in vivo* aus FTY720 über den gleichen Weg gebildet wie S1P aus Sphingosin, nämlich über die Sphingosinkinase (SphK). Vergleicht man die Paare Sph/S1P und FTY720/FTY720P, findet man deutliche Parallelen. Bei beiden liegt im Körper ein Gleichgewicht zwischen unphosphorylierter und phosphorylierter Form vor, nur die phosphorylierte Form wirkt an den jeweiligen S1P-Rezeptoren und die beiden Formen haben zum Teil entgegengesetzte Wirkungen (Brinkmann et al., 2002). Neben den Erkenntnissen hinsichtlich der Struktur neuer hochaffiner S1P-Rezeptor-Agonisten, wird hier die Bedeutung der Enzyme, die die S1P-Konzentration regulieren (SphK und S1P-Phosphatasen sowie nicht-selektive Lipidphosphatasen, siehe Absatz 1.2.1, Seite 14), immer deutlicher. Mit diesen Studien wird auch ein neues Gebiet in der S1P-Forschung – nämlich die Immunsuppression – entdeckt. Diese ersten Ergebnisse machen Hoffnung, evtl. ein Immunsuppressivum entwickeln zu können, welches bei Organtransplantationen spezifisch die Organabwehr unterdrückt, jedoch im Gegensatz zu den heute standardmäßig eingesetzten Substanzen Tacrolimus und Ciclosporin keinen Einfluss auf die körpereigenen Abwehrmechanismen bei viralen Infektionen hat.

Neben spezifischen Agonisten können spezifische Antagonisten für die Charakterisierung einzelner Rezeptoren sowie für die Zuordnung von Effekten zu einem bestimmten Subtyp von großem Wert sein. Ist ein beobachteter Effekt durch einen Rezeptor-spezifischen Antagonisten

hemmbar, wird die Zuordnung des Effektes zu dem entsprechenden Rezeptor ermöglicht. Daher verfolgten wir als nächstes das Ziel, die Lipide der Substanz-Bibliothek auf potentiellen Antagonismus an den humanen S1P-Rezeptoren in einem funktionellen FLIPR-Versuch zu testen. Nach Inkubation der transient transfizierten Zellen mit den jeweiligen Lipiden konnte jedoch keine komplette Hemmung des anschließenden S1P-Signals beobachtet werden. Da jedoch nach Inkubation bei einigen Substanzen in Mehrfachmessungen eine Beeinflussung der S1P-vermittelten Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet wurde (Abbildung 28, Seite 84), wurden diese dann einzeln auf allosterische Modulation der S1P-Rezeptoren getestet. Allosterisch wirkende Substanzen können durch Modulation der Rezeptorkonformation die Affinität des Liganden zum Rezeptor erhöhen oder erniedrigen, ohne dabei selber einen agonistischen Effekt auf den Rezeptor auszuüben. Sie binden nicht an der Ligandbindungsstelle des Rezeptors, sondern an einer von dieser abweichenden Stelle des Rezeptors (einen Überblick über den heutigen Stand des Wissens gibt Christopoulos & Kenakin, 2002). Hier stießen wir jedoch auf die Grenzen eines Versuchssystems mit hohem Durchsatz wie dem FLIPR. Die Identifizierung einiger Lipide als potentielle allosterische Modulatoren bei der Messung der Lipide der Substanz-Bibliothek konnte in der separaten Bestimmung der Einzelsubstanzen nicht bestätigt werden. Dies zeigt, dass sich das FLIPR-System sehr gut zum hohen Durchsatz beim Testen von Substanzen auf Agonismus und Antagonismus eignet, jedoch bei Effekten, die wie die Allosterie z.T. minimale Veränderungen bewirken, kein probates Werkzeug darstellt. Hier tragen dann geringe Schwankungen in der Zellzahl/well, ein ungleichmäßiger Lichteinfall, die Einfachbestimmung eines jeden Messpunktes bei der Verwendung der Substanz-Bibliothek sowie die zwingend erforderliche Messung von Hintergrundsignal und spezifischer Antwort auf zwei unterschiedlichen Platten zu Fehldeutungen bei.

Der einzige bisher beschriebene spezifische Antagonist für die S1P-Rezeptoren ist das Suramin, welches den S1P₃-Rezeptor spezifisch blockiert (Ancellin & Hla, 1999). Da zum Zeitpunkt der Untersuchung der hS1P₅-Rezeptor noch nicht bekannt war, wurde dieser damals nicht in die Untersuchung mit eingeschlossen. Um die Gültigkeit der Aussage, Suramin blockiere spezifisch den S1P₃-Rezeptor, zu überprüfen, testeten wir Suramin und dessen Analoges NF023 auf Antagonismus am hS1P₅-Rezeptor und konnten zeigen, dass beide Substanzen auch Hemmstoffe für den hS1P₅-Rezeptor darstellen (Abbildung 30, Seite 87). Suramin kann daher nicht mehr als spezifischer Hemmstoff des S1P₃-Rezeptors angesehen werden.

Da die Versuche, mit Hilfe der Expressionsprofile oder durch Identifizierung spezifischer Agonisten oder Antagonisten bis heute keinen entscheidenden Beitrag zur Zuordnung der S1P-Effekte zu bestimmten Rezeptor-Subtypen leisten konnte, ist die Charakterisierung der Signaltransduktionswege und zellulären Effekte jedes einzelnen Rezeptors unumgänglich. Diese sind in der Literatur auch für alle S1P-Rezeptoren mit Ausnahme des hS1P₅-Rezeptors

bereits ausführlich beschrieben und in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst (Fukushima et al., 2001; Pyne & Pyne, 2000). Ein weiterer Aspekt, die verschiedenen potentiellen Signaltransduktionswege eines Rezeptors zu untersuchen, ist das als „*agonist trafficking* der Rezeptor-Antworten“ von Kenakin (1995) beschriebene Phänomen. Hierbei kommt es in Abhängigkeit vom Liganden zur Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine und somit unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden über denselben Rezeptor. Kukkonen et al. (2001) konnten zeigen, dass am α_{2A} -Adrenozeptor verschiedene Liganden entweder die $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung oder die Hemmung der cAMP-Bildung mit hoher Affinität bewirken: Catecholamine waren potenter im Ca^{2+} -Versuch als im cAMP-Versuch, während die Imidazoline und Ox-/Thiazoloazepine im Ca^{2+} -Versuch deutlich weniger potent waren als im cAMP-Versuch. Die relativen Fähigkeiten, diese Effekte zu induzieren, unterschieden sich hier zwischen den Substanzgruppen um das 180fache. Ähnliche Beispiele finden sich z.B. für den Serotonin-Rezeptor (Berg et al. 1999).

Wir testeten daher eine Auswahl verschiedener Lipide in mehreren *second-messenger*-Versuchen und im GTP γ S-Bindungsversuch. Neben der Bestätigung der Befunde von Im et al. (2001), dass der hS1P $_5$ -Rezeptor die Adenylatzyklase über $G\alpha_i$ hemmt (siehe Abbildung 37, Seite 95), sind wir die ersten, die zeigen konnten, dass der hS1P $_5$ -Rezeptor $[Ca^{2+}]_i$ nicht über $G\alpha_q$, sondern über β/γ nach $G\alpha_i$ -Kopplung freisetzen kann, da nur im hochsensitiven und PTX-hemmbareren Aequorin-Versuch und nicht im FLIPR-Versuch die $[Ca^{2+}]_i$ Freisetzung ohne promiskuitives G-Protein gemessen werden konnte. Zudem konnten wir zeigen, dass durch Transfektion des Rezeptors die MAP-Kinase-Aktivierung unterdrückt wird (siehe Abbildung 39, Seite 99), der Rezeptor allerdings nicht zu einer Aktivierung des Rho-Signaltransduktionsweges mit anschließender *serum-response-element*-Aktivierung (siehe Tabelle 26, Seite 96) beiträgt. Interessanterweise konnten die $G\alpha_i$ -vermittelten Effekte (Hemmung der Adenylatzyklase sowie $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung) durch S1P induziert bzw. verstärkt werden, während die Hemmung der MAP-Kinase durch die alleinige Expression des Rezeptors induziert wurde, aber nicht durch S1P verstärkt werden konnte. Es bleibt spekulativ, ob in diesem Fall das beschriebene *agonist trafficking* der Rezeptor-G-Protein Interaktion eine Rolle spielt. Die im cAMP- und im MAP-Kinase-Versuch beobachtete liganden-unabhängige Aktivität wird an anderer Stelle erläutert (siehe Abschnitt 4.2, Seite 139). Die Hoffnung, mit Hilfe unterschiedlicher Versuchssysteme auf *second-messenger*-Ebene weitere Liganden zu identifizieren, bestätigte sich – zumindest im Bezug auf die ausgewählten Lipide - nicht. Umso erstaunlicher ist daher die Identifizierung von Sphingosin (Sph) neben den bekannten Liganden S1P und dhS1P als aktivierendes Lipid im GTP γ S-Versuch (siehe Abbildung 33, Seite 90). Die Vermutung, Sph könne einen anderen Signaltransduktionsweg anschalten als S1P und dhS1P, da es in keinem der vorausgegangenen Versuche als Ligand identifiziert worden ist, wurde durch die PTX-Sensitivität der GTP γ S-Bindung bei allen drei Lipide widerlegt

(siehe Abbildung 34, Seite 92). Eine enzymatische Umsetzung von Sph zu S1P durch die Sphingosinkinase kann aus mehreren Gründen so gut wie ausgeschlossen werden:

Kohama et al. (1998) zeigten, dass (i) die SphK in Vektor-transfizierten HEK293-Zellen eine vernachlässigbare Aktivität aufweist (20 pmol/min/mG-Protein), (ii) die im [³⁵S]GTP γ S-Versuch eingesetzte Membranfraktion der Zellen nur ~ 18% der gesamten SphK-Aktivität aufweist und (iii) zu vermuten ist, dass in den Membranfraktionen die erforderliche Menge an ATP ($EC_{50} = 93 \mu\text{M}$) nach der Präparation nicht mehr vorhanden ist. Berechnet man die potentielle maximal erreichbare Menge an zu S1P umgesetztem Sph mit den gegebenen Daten, einer Inkubationszeit der Lipide von max. 35 Minuten und der unrealistischen Annahme, dass das komplette eingesetzte Protein (6,25 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) ausschließlich SphK darstellt, kommt man auf einen Maximalwert von 4,45 pMol S1P (in 200 μl , das entspricht ca. 20 nM). Es wäre also in allen Sph-haltigen *wells* zur Bildung von 20 nM S1P gekommen und alle eingesetzten Sph-Konzentrationen hätten eine identische GTP γ S-Bindung induzieren müssen. Zusätzlich konnte auch in den cAMP-Versuchen, die mit intakten Zellen des gleichen Zellsystem durchgeführt wurden, bei einer ähnlichen Inkubationszeit für die Lipide (30 Minuten) kein Effekt von Sph beobachtet werden. Endgültige Gewissheit kann allerdings hier nur der Einsatz des SphK-Inhibitors Dimethylsphingosin liefern.

Vergleicht man die Effekte von S1P und Sph, fällt auf, dass diese beiden Lipide z.T. entgegengesetzte Effekte haben (Mandala et al., 2000; Cuvillier et al., 1996). Da die Lipide in einem dynamischen Gleichgewicht miteinander stehen, könnte die Aktivierung des Rezeptors durch beide Lipide darauf hinweisen, dass die Wirkungen des Rezeptors vom jeweiligen Zustand der Zelle und somit von der Lage des Sph/S1P-Gleichgewichtes abhängig sind. Weitere Untersuchungen, ob das Sph auch in funktionellen Versuchen eine agonistische Wirkung am hS1P₅-Rezeptor aufweist, können hier mehr Klarheit liefern.

Betrachtet man die chromosomale Lokalisation der S1P-Rezeptoren, fällt auf, dass insbesondere der hS1P₂- und der hS1P₅-Rezeptor auf demselben Chromosom sehr nah beieinander liegen. Mit unserer Charakterisierung des hS1P₅-Rezeptors konnte nun gezeigt werden, dass die zellulären Effekte der beiden Rezeptoren entgegengesetzt sind: Während der hS1P₅-Rezeptor die cAMP-Spiegel senkt, MAP-Kinasen hemmt, keine Aktivierung von Rho vermittelt und nicht an $G\alpha_q$ koppelt, bewirkt der hS1P₂-Rezeptor einen Anstieg der cAMP-Konzentration, stimuliert die Familie der MAP-Kinasen, aktiviert Rho-vermittelt das *serum response element* und bewirkt Ca^{2+} -Freisetzung über $G\alpha_q$. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Rezeptoren gegenseitig regulieren. Man bezeichnet diese Beobachtung als GPCR *cross talk* (Selbie & Hill, 1998), die Interaktion zwischen den Rezeptoren auf Signaltransduktionsebene als *fine-tuning*. Mit Hilfe dieses Mechanismus kann der Organismus gezielt auf die akuten physiologischen Gegebenheiten reagieren. Durch Hochregulation des einen oder anderen Rezeptorproteins können die Signale in die eine oder andere Richtung verschoben werden; ein prominentes Beispiel hierfür sind die

Angiotensin-Rezeptoren AT₁ und AT₂. Hier wird der AT₂-Rezeptor im Anschluss an Zellverletzungen hochreguliert, um die Wirkungen des AT₁-Rezeptors zu antagonisieren (Horiuchi et al., 1999). Entsprechende Regulationsstudien könnten auch beim hS1P₅-Rezeptor hilfreich sein, jedoch werden diese im Falle des S1P₅-Rezeptors durch die unterschiedliche Expression der humanen und Ratten-S1P₅-Rezeptoren erschwert.

4.1.2 Der S1P₅-Rezeptor des Menschen und der Ratte: Homolog, aber doch verschieden?

Im Gegensatz zu den meisten S1P-Rezeptoren, die ein weites Expressionsprofil aufweisen, zeigt der humane S1P₅-Rezeptor eine restriktivere Gewebeverteilung. Der Northern Blot weist hier zwei interessante Aspekte auf: (1) Der hS1P₅-Rezeptor ist in erster Linie in kardiovaskulären Geweben exprimiert (siehe Abbildung 23A, Seite 77), während der rS1P₅-Rezeptor ausschließlich im Hirn und zu geringeren Mengen in der Milz und in der Haut nachzuweisen ist (siehe Abbildung 23B, Seite 77); (2) der hS1P₅-Rezeptor kommt in zwei Splicevarianten vor, von denen das eine Transkript ausschließlich in den peripheren Geweben und das andere, schwächere Transkript im Hirn, in der Milz und in den peripheren Blutzellen zu finden ist. Die beiden Splicevarianten des rS1P₅-Rezeptors dagegen kommen immer gemeinsam in den den Rezeptor exprimierenden Geweben vor. Diese Unterschiede im Expressionsprofil des Rezeptors des Menschen und der Ratte, die wir trotz der sehr hohen Homologie zwischen den beiden beobachten konnten, könnten ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Rezeptoren unterschiedliche Rollen in der Physiologie des Menschen und der Ratte spielen: Der rS1P₅-Rezeptor repräsentiert wahrscheinlich ein Mitglied der S1P/LPA-Familie, welches seine Hauptfunktionen im ZNS hat, während das humane Orthologe wahrscheinlich noch zusätzlich in die Regulation der kardiovaskulären Homöostase einbezogen ist. Zusätzlich konnten Im et al. zeigen (2001), dass das Expressionsprofil des Maus-Homologen des S1P₅-Rezeptors, dem des rS1P₅-Rezeptors sehr ähnlich ist. Dies lässt auf einen generellen Unterschied in der Expression des S1P₅-Rezeptors in Menschen und Nagern schließen. Dieser Befund ist bis heute einzigartig für zwei Mitglieder der LPA/S1P-Familie und zeigt deutlich, dass S1P₅-Rezeptor-induzierte Effekte in Nagertiermodellen nur mit äußerster Vorsicht zu interpretieren sind. Dies ist bedeutend, da die Ratte eines der am häufigsten benutzten Versuchstiere ist und als das am besten funktionell charakterisierte Modellsystem gilt. Es bietet einzigartige Vorteile, menschliche Krankheiten nachzuahmen, neue therapeutische Substanzen zu entwickeln und Reaktionen auf Umwelteinflüsse zu studieren. Die Größe der Ratte ist ideal für viele physiologische Manipulationen (The Laboratory Rat, 1999). Zum Teil entstehen die Krankheiten aufgrund eines genetischen Defektes in den Tieren, der meistens durch Züchtung noch verstärkt wird. Eine weitere Möglichkeit ist es, die Blutzufuhr zu wichtigen Organen operativ zu unterbrechen und damit die Krankheit zu induzieren, wie zum Beispiel eine Herz- oder Niereninsuffizienz.

Entsprechende Untersuchungen an diesen etablierten Modellen können im Falle des S1P₅-Rezeptors nicht genutzt werden, so dass auch die geplante Untersuchung der Expressionsprofile in den bei Aventis etablierten Tiermodellen nicht durchgeführt werden konnte. Diese Problematik, inwiefern ein Tiermodell zur Untersuchung der Pathophysiologie von Krankheiten geeignet ist, wurde auch schon von anderen Gruppen adressiert (Tan et al., 2002; Bibb et al., 2001) und sollte bei der Auswahl der Modelle unbedingt in Betracht gezogen werden. Auf der anderen Seite können Unterschiede in der Genexpression oder -regulation zwischen Menschen und Tieren auch eine Chance beinhalten, Neues über die physiologische Relevanz des jeweiligen Gens zu lernen. Treten unerwünschte oder erwünschte Effekte, die eventuell mit dem untersuchten Gen in Zusammenhang stehen, in nur einer der beiden Spezies auf, können Rückschlüsse auf die Bedeutung des Gens gezogen werden.

Genetische Unterschiede können (El-Amraoui et al., 1996), müssen aber nicht mit funktionellen Unterschieden einhergehen (Kannius-Janson et al., 2000). Es drängt sich dennoch aufgrund der starken Expressionsunterschiede der S1P₅-Rezeptoren in Mensch und Ratte die Frage auf, ob sich diese Rezeptoren auch in pharmakologischer Hinsicht, wie zum Beispiel der Aktivierung durch verschiedene Liganden, unterschiedlich verhalten. Für alle humanen S1P-Rezeptoren sind bis heute nur S1P und dhS1P und evtl. LPA und SPC als niedrig affine Liganden beschrieben worden (Lee et al. 1998a; Gonda et al., 1999; Okamoto et al., 1998). Auch beim Testen der Lipide der Lipid-Substanz-Bibliothek an den fünf humanen S1P-Rezeptoren im Rahmen dieser Arbeit konnte kein zusätzliches Lipid als Ligand identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.1.3.1, Seite 81). Um eventuelle Unterschiede bezüglich der Liganden des humanen und rS1P₅-Rezeptors zu überprüfen, untersuchten wir die Wirkungen der 201 Lipide der Substanz-Bibliothek zusätzlich am S1P₅-Rezeptor der Ratte und konnten erstaunlicherweise zunächst mehrere zusätzliche Lipide als agonistische Liganden identifizieren, die alle strukturell zu den PAF-Derivaten gehören (siehe Abschnitt 3.1.3.1, Seite 81) und vorher keinen Einfluss auf das humane Homologe gezeigt hatten. Da sich diese Beobachtung jedoch aufgrund der hohen Instabilität der Substanzen (siehe Anhang E, Seite 159) nicht durch Messung der Einzelsubstanzen reproduzieren ließ und somit auch keine parallelen Untersuchungen der beiden Rezeptoren unter komplett identischen Versuchsbedingungen durchgeführt werden konnten, kann im Hinblick auf die unterschiedliche Ligandenaffinität der S1P₅-Rezeptoren verschiedener Spezies keine verlässliche Aussage getroffen werden. Dennoch sind diese Befunde von Wert, da sie einen Hinweis auf strukturelle Bedingungen für das Modellieren neuer S1P₅-Rezeptorliganden liefern können.

Als nächstes wurden eventuelle Unterschiede in der Wirkung von Suramin sowie dessen Analogem NF023 auf die S1P-induzierte Calciummobilisierung des S1P₅-Rezeptors des Menschen und der Ratte untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass der hS1P₅-Rezeptor deutlich empfänglicher für die Hemmung durch Suramin und NF023 ist als das Orthologe der Ratte (siehe Abschnitt 3.1.3.3, Seite 86). Die Wirkung von Suramin und

NF023 in unserem Versuchssystem scheint aus mehreren Gründen eher auf die Blockade der Rezeptor-Liganden-Interaktion und nicht auf eine unspezifische Hemmung der Kopplung von Rezeptor und G-Protein zurückzuführen zu sein: (i) der hS1P₅-Rezeptor reagiert deutlich empfindlicher auf die Hemmung durch NF023 und Suramin als der rS1P₅-Rezeptor, (ii) die Intensität der Hemmwirkung am rS1P₅-Rezeptor war identisch, ob G α_{q15} exprimiert wurde oder nicht (diese vergleichenden Messungen erfolgten in HEK293-Zellen, die auch ohne G-Protein-Kotransfektion ein messbares Signal geben, keine Abbildung), (iii) der G α_i -gekoppelte Dopamin-Rezeptor D₂ wurde bei Koexpression mit G α_{q15} weder von Suramin noch von NF023 gehemmt (siehe Einschübe Abbildung 30, Seite 87).

Dieser speziesspezifische Antagonismus von Suramin und NF023, welche bevorzugt den menschlichen Rezeptor blockieren, ist überraschend, da die Homologie der Rezeptoren mit ca. 87% sehr hoch ist. Dennoch existieren Unterschiede insbesondere in der extrazellulären Rezeptorsequenz, die offensichtlich für die unterschiedlichen Effekte der Antagonisten ausreichend sind.

Während die Effekte der S1P₅-Rezeptoren des Menschen und der Ratte in Bezug auf die Hemmung der Adenylatzyklase, die fehlende Aktivierung von Rho, das Binden von GTP γ S sowie die Induktion morphologischer Veränderungen von Zellen identisch waren, konnten unterschiedliche Wirkungen der Rezeptoren auf die Zellproliferation beobachtet werden (siehe Abbildung 43, Seite 103). Die Tatsache, dass die Expression des rS1P₅-Rezeptors in Säugerzellen zu einer Hemmung des Zellwachstums führt, während die Expression des humanen Rezeptors keine Wirkungen zeigt, unterstützt die Vermutung, dass die Rezeptoren unterschiedliche physiologische/pathophysiologische Wirkungen haben könnten. Es wäre interessant, die Ursache der dargestellten Unterschiede zu untersuchen, da die in der Signaltransduktionskaskade früh auftretenden Signale (z.B. Hemmung der Adenylatzyklase durch G α_i) bei beiden Rezeptoren identisch sind. Später einsetzende Signale, wahrscheinlich auf der Ebene von MAP-Kinasen, könnten für die unterschiedlichen proliferativen Wirkungen der Rezeptoren verantwortlich sein. MAP-Kinasen werden in der Literatur immer wieder mit den Effekten auf das Zellwachstum in Verbindung gebracht, da durch die Blockade dieser Kinasen die proliferativen Effekte einiger Wachstumsfaktoren unterbunden wurden (einen Überblick gibt Gutkind et al., 1998).

Coussin et al. (2002) stellten überraschenderweise bei Untersuchungen an glatten Muskelzellen der Ratte von zerebralen Arterien sowie der Aorta fest, dass eine S1P-vermittelte Vasokonstriktion nur in den zerebralen Arterien erfolgte. Auch wenn die Gruppe in ihren Expressionsstudien in den untersuchten Zellarten den S1P₅-Rezeptor nicht mit einbezogen haben, weisen unsere Expressionsdaten darauf hin, dass der rS1P₅-Rezeptor nur in den zerebralen Arterien zu finden sein wird. Es wäre nun interessant zu untersuchen, ob sich humane glatte Muskelzellen der Aorta – hier konnten wir die Expression des hS1P₅-Rezeptors nachweisen (siehe Abbildung 22, Seite 76) - im Gegensatz zu denen der Ratte durch S1P

stimulieren lassen und sich somit eine physiologische Relevanz der beschriebenen Unterschiede zwischen dem Rezeptor der Ratte und des Menschen ableiten lässt.

Zukünftige Untersuchungen, ob sich diese Unterschiede von humanem und rS1P₅-Rezeptor auch in weiteren *in-vitro* und *in-vivo*-Versuchen wiederfinden lassen, können einen Hinweis darauf geben, ob sich die Rezeptoren in ihrer physiologischen Bedeutung tatsächlich unterscheiden.

4.1.3 Der hGPR63 - ein S1P-Rezeptor mit niedriger Affinität

Ein potentieller LPA-Rezeptor aus *Xenopus*-Oozyten (xPSP24), der nur ca. 20% Identität zu den LPA/S1P-Rezeptoren aufweist, konnte 1996 von Guo et al. identifiziert werden. Ein humanes Homologes dieses Rezeptors - der *orphan*-hGPR45 (auch PSP24 α genannt) -, dessen Ligand jedoch noch nicht identifiziert werden konnte, wurde kurz darauf kloniert (Marchese et al., 1999). Bei einem bioinformatischen Suchvorgang konnten wir einen weiteren humanen *orphan*-Rezeptor identifizieren, der eine ~ 57 %ige Identität zum xLPA-Rezeptor und 54,3%ige Identität zum hGPR45 besitzt (Kawasawa et al., 2000a). Parallel zu unseren Untersuchungen wurde dieser Rezeptor als PSP24 β (Kawasawa et al., 2000a) und hGPR63 (Lee et al., 2001) veröffentlicht. Die phylogenetischen Daten und hierbei besonders die hohe Homologie zum LPA-Rezeptor xPSP24 implizierten, dass es sich bei den beiden Rezeptoren eventuell um LPA-Rezeptoren handeln könnte. Bei der Verfolgung dieser *deorphaning*-Strategie konnten Kawasawa et al. (2000b) weder in Bindungsversuchen noch in funktionellen Untersuchungen Effekte von LPA auf diese Rezeptoren nachweisen. Da auch wir keinen Effekt von LPA an diesen Rezeptoren messen konnten (hierfür wurden McARH7777-Zellen verwendet, die kein endogenes LPA-Hintergrundrauschen zeigen, keine Abbildung), wurden zunächst S1P als strukturell sehr ähnliches Lipid zu LPA sowie die Lipide der Lipid-Substanz-Bibliothek an den Rezeptoren in einem funktionellen FLIPR-Versuch nach Kotransfektion mit verschiedenen G-Proteinen ausgetestet. Hierbei konnten nur S1P und dhS1P als niedrig affine Liganden des hGPR63 identifiziert werden (siehe Abbildung 51, Seite 111), während weiterhin kein Ligand für den hGPR45 bekannt ist. Die Identifizierung des hGPR63 als S1P-Rezeptor erweitert die Familie der S1P-Rezeptoren um ein weiteres Mitglied mit niedriger Affinität für S1P. Trotz der relativ hohen S1P-Konzentration, die im Vergleich zu den S1P₁₋₅-Rezeptoren (hier liegen die EC₅₀-Werte im niedrig nanomolaren Bereich) erforderlich ist, um den hGPR63 zu aktivieren, könnte der Rezeptor ein physiologisch relevantes Zielprotein für S1P darstellen. Die Konzentrationen in Plasma und Serum betragen ca. 200 nM bzw. 500 nM (Yatomi et al., 1997) und sind somit ausreichend hoch, um den Rezeptor zu aktivieren. Nach autokriner oder parakriner Stimulation der Zellen kann die Konzentration an S1P noch weiter steigen (Hobson et al., 2001). Ob es weitere hochaffine Liganden für diesen Rezeptor gibt (in unserer Untersuchung von 201 bioaktiven Lipiden konnte kein weiterer identifiziert werden), oder ob

der Rezeptor von Natur aus so konzipiert ist, nur bei sehr hohen Konzentrationen des Liganden seine Effekte auszuüben, ist noch unklar. Für letztere Hypothese spricht die Beobachtung von S. Wilson (persönliche Mitteilung), die nachweisen konnte, dass β -Hydroxybutyrat erst in mikromolaren Konzentrationen den GPR43 aktiviert. Da solche Konzentrationen nur in pathologischen Zuständen der Ketoazidose erreicht werden, spricht dies für den „Einsatz“ des Rezeptors unter pathologischen Bedingungen.

Interessanterweise konnten wir die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ nur nach Kotransfektion mit $G\alpha_{\Delta 6qj4myr}$ messen, was darauf hinweist, dass der Rezeptor endogen an $G\alpha_i$ koppelt und ein promiskuitives G-Protein benötigt, um die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ zu induzieren. Warum jedoch $G\alpha_{qj5}$, welches nach heutigem Wissen denselben Effekt auf $G\alpha_i$ -gekoppelte Rezeptoren hat (Kostenis, 2001), nicht in der Lage war, die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ zu induzieren, bleibt offen. Diese Beobachtung könnte jedoch einen Hinweis darauf geben, dass die verbesserte Membranverankerung des $G\alpha_{\Delta 6qj4myr}$ (Kostenis, 2002) besonders bei niedrig affinen oder in rekombinanten Systemen schlecht exprimierten Rezeptoren (hierzu gehört auch der hGPR63, keine Abbildung) einen Vorteil gegenüber $G\alpha_{qj5}$ aufweist.

Im Gegensatz zu dem von Guo et al. (1996) beschriebenen xPSP24-Rezeptor, der nur eine 20%ige Homologie zu den LPA-Rezeptoren aufweist, konnten Kimura et al. (2001) zwei weitere LPA-Xenopus-Rezeptoren – xLPA_{A1}-1 und xLPA_{A1}-2 - klonieren, die eine ca. 90%ige Identität zum LPA₁-Rezeptor aus Säugetieren aufweisen. Überexpression der beiden Rezeptoren in Xenopus-Oozyten potenzierte LPA-vermittelte Chloridströme, Überexpression in B103-Neuroblastenzellen bewirkte ein LPA-induziertes Abrunden der Zellen sowie die Hemmung der Adenylatzyklase in diesem Zelltyp, welcher endogen nicht auf LPA reagiert. Zusammen mit dem xPSP24-Rezeptor (Guo et al., 1996) bilden diese drei Rezeptoren eine Familie von hoch affinen Xenopus-LPA-Rezeptoren. Es ist erstaunlich, dass der xPSP24-Rezeptor mit nur 20% Identität zu den LPA-Rezeptoren aus Säugern oder den xLPA_{A1}-1/2-Rezeptoren dennoch ein LPA-Rezeptor ist. In Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass die hoch konservierte Aminosäure Glutamin in der zweiten extrazellulären Schleife der LPA₁₋₃-Rezeptoren eine entscheidende Rolle für die Interaktion mit der Hydroxylgruppe des LPA spielt (Wang et al., 2001). Interessanterweise besitzt der xPSP24-Rezeptor dieses Glutamin, während den Homologen des Menschen und der Maus - GPR45 und GPR63 - dieses Glutamin fehlt. Dieser Befund unterstreicht die Aussage, dass der Xenopus-Rezeptor ein LPA-Rezeptor ist, während die Orthologen aus Säugern die Fähigkeit, auf LPA zu reagieren, im Laufe der Evolution verloren haben. Unsere Versuche sowie die von Kawasawa et al. (2000b), in denen weder der hGPR45 noch der hGPR63 auf LPA reagierten, unterstützen diese Hypothese. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Rezeptoren durch Einführen eines Glutamins an der entsprechenden Stelle die Fähigkeit, auf LPA zu reagieren, wiedererlangen können. In der Familie der S1P-Rezeptoren findet sich an dieser Stelle ein hoch konserviertes Glutamat in allen Subtypen, welches mit der Ammoniumgruppe des S1P Ionenpaare ausbildet (Parill et al., 2000). Erstaun-

licherweise befindet sich beim hGPR63, der auch auf S1P reagiert, anstelle des Glutamats (E121) ein Phenylalanin (siehe Anhang B, Seite 150). Das Fehlen dieser entscheidenden Aminosäure könnte eine Ursache für die niedrigere Affinität des S1P am hGPR63 sein. Dies wird durch die Befunde unterstützt, dass S1P₁-Rezeptormutanten wie z.B. E121Q oder E121A, in denen die hoch konservierte Aminosäure zur Bildung des Ionenpaares mit S1P durch andere Aminosäuren (A: Alanin; Q: Glutamin; E: Glutaminsäure) ersetzt worden ist, nur durch mikromolare Konzentrationen von S1P aktiviert werden können.

Während Lee et al. (2001) die Expression von hGPR63 ausschließlich in verschiedenen Regionen des Hirns untersuchten, konnten wir den Rezeptor zusätzlich in mehreren kardiovaskulären Geweben (u.a. Aorta, Herz und Niere; siehe Abbildung 57 A, Seite 117) nachweisen. Die quantitative Analyse zeigt, dass neben der relativ hohen Expression im gastro-intestinalen Bereich die größten RNA-Mengen im Hirn zu finden sind (siehe Abbildung 59, Seite 119). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Lee et al., die höchstens eine semiquantitative Beurteilung der Verteilung des hGPR63 in verschiedenen Regionen des Hirns zulassen, konnten wir mittels Echt-Zeit-PCR zeigen, dass der Rezeptor in Thalamus und Nucleus caudatus die höchste Expression aufweist (siehe Abbildung 60, Seite 120). Da der Thalamus in erster Linie für die Vermittlung sensorischer Reize zuständig ist, könnte der GPR63 eine Rolle bei Fehlfunktionen in diesem Bereich spielen.

Vor kurzem konnte Oleoylethanolamin (OEA), ein natürlich vorkommendes Analogon des Cannabinoids Anandamid, als neuer Effektor identifiziert werden, der in die periphere Steuerung der Ernährung involviert ist (Rodriguez de Fonseca et al., 2001). Die systemische, jedoch nicht die intrazerebroventrikuläre Applikation von OEA unterdrückte die Nahrungsaufnahme in Ratten. Des Weiteren variierten die OEA-Konzentrationen signifikant zwischen dem Hungerzustand und der anschließenden erneuten Nahrungsaufnahme (Rodriguez de Fonseca et al., 2001). Dies lässt vermuten, dass das Zielprotein für OEA im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) zu finden ist. Im Gegensatz zu Anandamid zeigt OEA jedoch keine Wirkungen auf die Cannabinoid-Rezeptoren (Devane et al., 1992). Aufgrund der beschriebenen hohen Expression von hGPR63 im GI-Trakt testeten wir, ob OEA einen Liganden für den hGPR63 sowie für dessen Homologes hGPR45 darstellt. Wir konnten jedoch im FLIPR-Versuch keine Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ als Antwort auf OEA (bis 30 μ M) über den hGPR63 oder den hGPR45 feststellen (siehe Abbildung 54, Seite 114).

Alderton et al. (2001) konnten vor kurzem zeigen, dass Phosphatidsäure (PA) und einige strukturell verwandte Substanzen wie Dioleoylphosphatidsäure (doPA) über einen $G\alpha_{i/o}$ -abhängigen Mechanismus die p42/44-MAPK-Signaltransduktion in HEK293-Zellen aktivieren. Die Gruppe vermutete, dass der hGPR45 ein vermeintlicher Kandidat für die Vermittlung dieser Effekte sein könnte. Wir konnten zeigen, dass nicht der GPR45, sondern der GPR63 von doPA - wenngleich mit niedriger Affinität (siehe Abbildung 54, Seite 114 und Abbildung 56, Seite 115) - aktiviert wird. Dennoch ist dies die erste Beschreibung, dass doPA als extrazellulärer

Mediator über einen bestimmten GPCR wirkt. Wir haben nicht untersucht, ob doPA den p42/44-MAPK-Signaltransduktion in hGPR63-transfizierten Zellen aktiviert. Da der Rezeptor jedoch in HEK293Zellen exprimiert ist (Abbildung 58, Seite 118) und doPA in diesen Zellen MAPK aktiviert, könnte der hGPR63 potentiell an der Vermittlung der doPA-Effekte beteiligt sein.

In einer Untersuchung von Litosch (2002) wurde PA als Regulator der basalen sowie der G-Protein-stimulierten PLC- β 1-Aktivität in zerebralen, kortikalen Membranen beschrieben. Durch Modulationen in der Acylkettenlänge von PA wurde keine Veränderung in den beobachteten Effekten festgestellt. Zusammen mit dem Befund von Alderton et al. (2001), dass PA ein hochpotenter GPCR-Agonist ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Beeinflussung der PLC- β 1-Aktivität durch PA und strukturell verwandte Substanzen über die Stimulation von Rezeptor/G-Protein-Kopplung bewirkt wird. Der hGPR63 könnte daher mit seiner hohen Expression im Hirn und seiner Affinität für das dem PA strukturell ähnliche doPA bei der PA-Regulierung von PLC- β 1 und der Modulation der Zellaktivierung eine Funktion ausüben. Weitere Untersuchungen sind allerdings erforderlich um festzustellen, ob es zusätzliche Rezeptoren für die Vermittlung dieser Effekte geben könnte, oder ob alternativ PA seine Wirkungen durch direkte Interaktion mit dem Effektor (G-Protein oder PLC- β 1) ausübt. In diesem Zusammenhang ist es interessant festzustellen, dass mehrere Lipide wie S1P, LPA und dhS1P zunächst als intrazelluläre Mediatoren (*second messenger*) angesehen worden sind, heute allerdings bewiesen ist, dass viele ihrer Wirkungen über GPCRs in der Plasmamembran vermittelt werden. PA, welches durch DAGK (Diacylglycerolkinase) aus DAG (Diacylglycerol) gewonnen wird (siehe Abschnitt 1.2.1, Seite 16), wurde lange als intrazellulärer Effektor (in-vitro- und in-vivo-Regulation von Enzym-Aktivitäten; Rizzo & Romero, 2002) angesehen. Aufgrund unseres Befundes, dass der hGPR63 einen niedrig affinen Rezeptor für doPA darstellt, kann PA - wie auch schon S1P, LPA und dhS1P - nun zu der Gruppe der Lipidmediatoren mit extrazellulären (mittels spezifischer GPCRs) und intrazellulären Funktionen hinzugefügt werden.

Die Effekte von S1P auf die Zellproliferation werden über verschiedene S1P-Rezeptoren vermittelt. Während wir zeigen konnten, dass der hS1P₅-Rezeptor keinen Einfluss auf die Zellproliferation hat (siehe Abbildung 43, Seite 103), stimulieren andere wie der S1P₁-Rezeptor das Zellwachstum sowie die Mitogenese (Kluk & Hla 2001). Wir konnten beobachten, dass S1P in mit dem hGPR63-transfizierten Zellen im Gegensatz zu Vektor-transfizierten Kontrollzellen proliferativ wirkte (siehe Abbildung 61, Seite 121). Da die proliferativen Effekte des hGPR63 im Gegensatz zu denen des S1P₁-Rezeptors nicht PTX sensitiv waren (siehe Abbildung 62, Seite 121), werden diese nicht über G α_i vermittelt. Die physiologische Relevanz der S1P-induzierten Zellproliferation ist noch unklar, es ist jedoch weithin akzeptiert, dass die Proliferation - besonders in glatten Muskelzellen - ein wichtiger Teil der Entwicklung der Blutgefäße (Hungerford et al., 1999), der Atherosklerose, des Bluthochdrucks und der

Restenose ist (Libby et al., 2000, Schwartz et al., 1998). Ob der hGPR63 - dessen Expression wir in verschiedenen glatten Muskelzellen nachweisen konnten (siehe Abbildung 58, Seite 118) - hierbei zusammen mit den anderen S1P-Rezeptoren eine Rolle spielt, ist noch völlig unklar und muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Wie schon für die Familie der LPA/S1P-Rezeptoren erläutert, ist die Bedeutung der Expression des hGPR63 in Endothelzellen (siehe Abbildung 58, Seite 118) noch nicht geklärt und erfordert noch weitere Untersuchungen, da die Effekte von S1P auf Endothelzellen – wie Schutz vor Apoptose in HUVECS (Hisano et al., 1999) oder Induktion von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten bei Endothelzellen - noch keinem S1P-Rezeptor Subtyp zugeordnet werden konnten.

Die Tatsache, dass es noch keinen käuflich erwerbbaeren Antikörper gegen hGPR45 und hGPR63 gibt, mit dem zuverlässig die Expression der Rezeptoren in den in dieser Arbeit hergestellten stabilen Zelllinien hätte nachgewiesen werden können, macht die Interpretation der cAMP-, GTP γ S- und Rho-Aktivierungsversuche schwierig. Auch wenn die FLIPR-Versuche die Funktionalität der stabilen Zelllinie des hGPR63 zu beweisen scheinen, ist der Befund, dass keine GTP γ S-Bindung – auch nicht bei 10 μ M S1P - beobachtet werden konnte, beunruhigend. Dies könnte auf der einen Seite darauf hinweisen, dass die niedrige Expression des Rezeptors auch in stabilen Zelllinien bestimmte Messungen erschwert oder unmöglich macht oder dass der Rezeptor bei der Passagierung der Zellen zunehmend niedriger exprimiert und somit verloren wurde.

Auf eine Interpretation der Daten für den hGPR45 soll hier verzichtet werden, da aufgrund des fehlenden Liganden alle Vermutungen hoch spekulativ wären.

4.2 Die konstitutive Aktivität des S1P₅-Rezeptors bei verschiedenen zellulären Effekten

In den letzten Jahren sind viele Untersuchungen zur konstitutiven Aktivität von GPCRs durchgeführt worden, wobei die meisten dieser Studien folgende Fragestellungen verfolgten: (i) welche Konformationsänderungen werden durch die Ligand-Bindung an GPCRs bewirkt, (ii) welche speziellen Eigenschaften treten bei der liganden-induzierten Internalisierung auf, (iii) welche speziellen Eigenschaften sind beim *Trafficking* – dem Weg des Rezeptors aus der Zellmembran ins Zellinnere - zu beobachten und (iv) werden die Rezeptoren durch inverse Agonisten hochreguliert (Mc Cune et al., 2000; Stevens et al., 2000; Miserey-Lenkei et al., 2002; Chen et al., 2002). Einige Studien widmeten sich der Frage, inwieweit die durch Mutationen in verschiedenen Regionen des Rezeptors bedingte konstitutive Aktivität einen Einfluss auf die unterschiedlichen Signaltransduktionswege von GPCRs haben kann (Perez et al., 1996). Zusammen mit weiteren Befunden auf diesem Gebiet wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich verschiedene konstitutiv aktive Mutanten eines Rezeptors in ihrer Regulation durch Antagonisten und inverse Agonisten sowie in der durch die Mutationen

hervorgerufenen Konformationsänderungen der Rezeptoren unterscheiden (Stevens et al., 2000).

Demgegenüber ist die konstitutive Aktivität von Wildtyp-Rezeptoren (wt), die in der Lage sind, mehrere verschiedene zelluläre Antworten zu induzieren, noch sehr wenig untersucht worden. Unter anderem drängt sich hier die Frage auf, inwiefern sich diese Eigenschaft unterschiedlich auf die Beeinflussung der verschiedenen Signaltransduktionswege auswirkt.

Für die S1P-Familie mit den Rezeptoren S1P₁₋₄ (Lee et al., 1998b; van Brocklyn et al., 1999) sind intrinsische Effekte auf Zellen beschrieben worden. Allerdings wird die „konstitutive Aktivität“ durch die Präsenz des allgegenwärtigen Liganden S1P in den Zellkulturmedien bedingt. Im Falle des S1P₁-Rezeptors erleichterte die Anwesenheit des Liganden im Medium die Identifizierung dieses Rezeptors (Lee et al., 1998a). Stabile Expression des S1P₁-Rezeptors in HEK293-Zellen steigerte die auf der Bildung von bindenden Proteinen (Catherinen und Cateninen) beruhende Adhäsion zwischen den Zellen und induzierte die phänotypische Differenzierung der Zellen (Lee et al., 1998b). Nachdem die Lipide aus dem Medium durch Aktivkohleabsorption des FCS entfernt worden waren, konnten die beschriebenen morphologischen Effekte nicht mehr beobachtet werden, da der induzierende Faktor – der später als S1P identifiziert werden konnte - entfernt worden war. Im Falle des S1P₁-Rezeptors sind die phänotypischen Veränderungen daher keine Folge von konstitutiver Aktivität durch liganden-unabhängige Signaltransduktion, sondern eine Folge des im Medium anwesenden S1P. Inzwischen ist von mehreren Mitgliedern der S1P-Familie nach Transfektion in verschiedenen Zelltypen ein Einfluss auf deren Phänotyp (Morphologie, Proliferation, Formation von Stress-Filamenten, Reorganisation des Zytoskeletts u.a.) beschrieben worden (Lee et al., 1998b; Moolenaar, 1999; van Brocklyn et al., 1999; Lee et al., 1999b; Robert et al., 2001). Diese Effekte waren jedoch immer an die Anwesenheit von Lipiden im Medium gebunden. Hinweise, dass S1P-Rezeptoren auch liganden-unabhängige Wirkungen haben können, sind bisher in der Literatur noch nicht zu finden. Die einzige Ausnahme bildet die von Malek et al. (2001) beschriebene, sehr schwach ausgeprägte intrinsische Hemmwirkung des rS1P₅-Rezeptors auf die Proliferation von CHO-K1-Zellen sowie die in einem GTP γ S-Versuchssystem von Windh et al. (1999) detektierte ligand-unabhängige Stimulation von G-Proteinen durch die S1P₁₋₃-Rezeptoren. Letztere wurde jedoch nie in funktionellen Versuchen der jeweiligen Rezeptoren bestätigt. In dieser Arbeit wurden mehrere signifikante, ligand-unabhängige Wirkungen des humanen und rS1P₅-Rezeptors untersucht. Da beide Rezeptoren im Hinblick auf die konstitutive Aktivität ein identisches Profil aufweisen, wird in diesem Kapitel generell der S1P₅-Rezeptor spezies-unabhängig diskutiert.

Als erstes wurde festgestellt, dass die stabile Expression des S1P₅-Rezeptors in HEK293-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der basalen cAMP-Produktion – und somit zur Hemmung der Adenylatzyklase - führte. Dieser Effekt auf die basale cAMP-Konzentration war unabhängig von der Art des verwendeten Mediums: sowohl in Lipid-haltigem (10% FCS) als

auch in Lipid-freiem (10% csFCS) Medium waren sie statistisch signifikant (siehe Abbildung 35, Seite 93). Diese Befunde weisen auf die konstitutive Aktivität des S1P₅-Rezeptors in Abwesenheit des stimulierenden Liganden hin. Um zu untersuchen, ob eine Modulation der Effekte des S1P₅-Rezeptors auf die basale cAMP-Produktion durch S1P hervorzurufen ist, wurden die Zellen in csFCS kultiviert und anschließend mit 1 μ M S1P stimuliert. Hierbei konnte keine statistisch signifikante weitere Reduktion der cAMP-Konzentration beobachtet werden (siehe Abbildung 36 A, Seite 94). Dennoch kann nicht eindeutig behauptet werden, dass die konstitutive Hemmung der Adenylatzyklase durch den S1P₅-Rezeptor nach Ligandenzugabe nicht mehr verstärkt werden kann, da in den Vektor-exprimierenden Zellen ein kleiner (ca. 10%), aber signifikanter Anstieg der Adenylatzyklase-Aktivität beobachtet werden konnte. Dieser Effekt könnte eventuell die S1P-vermittelte Hemmung der Adenylatzyklase durch den S1P₅-Rezeptor maskieren. Auf der anderen Seite konnte jedoch kein Unterschied zwischen den basalen cAMP-Niveaus bei mit dem S1P₅-Rezeptor transfizierten Zellen einerseits und Vektor-transfizierten Zellen andererseits in FCS oder csFCS festgestellt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass das im Serum vorhandene S1P (~ 400 nM in FCS) keinen Einfluss auf die durch den S1P₅-Rezeptor-vermittelte intrinsische Hemmung der Adenylatzyklase hat. Ein weiterer Befund, der die Hypothese der konstitutiven Aktivität des S1P₅-Rezeptors unterstützt, ist die Tatsache, dass auch durch die Stimulation mit Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylatzyklase, niedrigere cAMP-Mengen in den S1P₅-Rezeptor-exprimierenden Zellen detektiert wurden (siehe Abbildung 36 B, Seite 94).

Einige GPCRs, wie zum Beispiel die Rezeptoren für LPA, Endothelin, Angiotensin II, Bombesin und Thrombin, sind in der Lage, Stressfasern, Reorganisation des Zytoskeletts und das Abrunden von Zellen zu induzieren (Hecht et al., 1999; Ishida et al., 1999; Sinnott-Smith et al., 2001; Kawanabe et al., 2002). Dass diese Effekte auf Zellen häufig durch den G $\alpha_{12/13}$ - Rho-Signaltransduktionsweg vermittelt sind, konnte schon mehrfach gezeigt werden (Lawrenson et al., 2002). Die Vermutung, dass dem durch den S1P₅-Rezeptor vermittelten Abrunden von CHO-K1-Zellen (siehe Abbildung 42, Seite 102) auch der oben erwähnte Signaltransduktionsweg zugrunde liegen könnte, lag daher sehr nahe. Dennoch konnte bei der Verwendung eines Reporterassays keine Aktivierung des G $\alpha_{12/13}$ -Rho-Signaltransduktionsweges nachgewiesen werden (siehe Tabelle 26, Seite 96). Ein noch direkterer Nachweis für die Beteiligung des G $\alpha_{12/13}$ -Rho-Signaltransduktionsweges wäre die Durchführung des Experimentes in Zelllinien gewesen, denen entweder G α_{12} , G α_{13} oder G $\alpha_{12/13}$ fehlt. Daher wurde in Kooperation mit Herrn A. Blaukat (Universität Heidelberg) die Induktion morphologischer Veränderungen nach S1P₅-Rezeptor-Transfektion in wt-Mausfibroblasten mit denen in G $\alpha_{12/13}$ -deletierten Fibroblasten verglichen. Es konnte jedoch schon in den wt-Zellen keine Veränderung in der Zellmorphologie beobachtet werden, so dass weitere Untersuchungen nicht mehr sinnvoll erschienen. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Rezeptor-induzierten morphologischen Veränderungen zelltypspezifisch sein könnten. Sie

können jedoch nicht komplett ausschließen, dass es sich bei der involvierten Signaltransduktionskaskade dennoch um die $G\alpha_{12/13}$ -Rho-Schiene handelt. Die Beteiligung des G-Proteins $G\alpha_i$ bei der Vermittlung der morphologischen Effekte konnte durch den Nachweis der PTX-Unabhängigkeit komplett ausgeschlossen werden. Unabhängig vom verwendeten Signaltransduktionsweg waren jedoch die beobachteten Veränderungen des Zellphänotyps durch Expression des $S1P_5$ -Rezeptors wie auch schon die Erniedrigung der basalen cAMP-Konzentrationen ligand-unabhängig (siehe Abbildung 42 3, 4, Seite 102). Im Gegensatz zu den cAMP- sowie zu den ERK-Phosphorylierungsversuchen (siehe Abbildung 36, Seite 94 und Abbildung 39, Seite 99) konnten die morphologischen Veränderungen allerdings durch den Liganden S1P (durch Verwendung von Medium mit FCS) noch weiter verstärkt werden. Diese Befunde implizieren, dass unterschiedliche Signaltransduktionswege, die von einem konstitutiv aktiven GPCR genutzt werden, nicht in identischer Weise angeschaltet werden und somit die Identifizierung von (partiellen) inversen Agonisten ein hilfreiches Werkzeug darstellen könnte, um die Pharmakologie der individuellen GPCR-vermittelten Signale differenziert zu untersuchen.

Im Anschluss an das Abrunden von Zellen kommt es häufig zur Apoptose, welche in den Herz-Kreislaufkrankungen besonders nach Herzinfarkt/Ischämie oder beim Herzversagen eine Rolle spielt (Neuss et al., 2001; Bennet, 2002). Van Brocklyn et al. (1999) haben vor kurzem beschrieben, dass durch Expression des $rS1P_2$ -Rezeptors in HEK293-Zellen sowie in geringem Maße des $S1P_3$ -Rezeptors ein Abrunden der Zellen sowie Zeichen von Apoptose (durch Anfärbung der fragmentierten DNA im Zellkern nachgewiesen) induziert werden können. Es lag daher nahe zu untersuchen, ob auch die durch den $S1P_5$ -Rezeptor in CHO-K1-Zellen verursachten morphologischen Veränderungen den Zelltod herbeiführen können. Besonders interessant war hierbei die Tatsache, dass aufgrund der ligand-unabhängigen Effekte des Rezeptors die alleinige Expression des $S1P_5$ -Rezeptors in den Zellen zum Zelltod führen würde und somit dem Rezeptor an sich eine zentrale Rolle in den apoptotischen Ereignissen zukommen würde. Unsere Versuche konnten jedoch zeigen, dass das Abrunden der Zellen nicht mit Apoptose in Verbindung gebracht werden kann. Bei der DAPI-Färbung – hier werden die bei der Apoptose auftretenden DNA-Fragmente blau angefärbt – war kein Hinweis auf vermehrten Zelltod durch Transfektion des $S1P_5$ -Rezeptors zu erkennen (siehe Abbildung 44, Seite 104). Auch die Untersuchungen, ob es zu einer Caspase-Aktivierung durch Transfektion des $S1P_5$ -Rezeptors kommt, zeigten, dass weder S1P-unabhängig noch S1P-abhängig Apoptose induziert wurde (siehe Abbildung 45, Seite 105). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Aktivierung der GTPase Rho mit dem Auflösen und der Ausbildung von Ausstülpungen bei Membranen (*membraneblebbing*) im Endstadium der Apoptose in Verbindung gebracht worden ist (Mills et al., 1998). Des Weiteren ist der Rho-Effektor PKN (Proteinkinase N) ein weiterer möglicher Apoptosemediator, da dieser proteolytisch durch Caspasen zerschnitten wird und dabei konstitutiv aktive Kinase-Fragmente bildet (Takahashi et al., 1998). Diese

Verknüpfungen zwischen dem Rho-Signaltransduktionsweg und der Apoptose konnten jedoch bisher noch nicht direkt anhand spezifischer Moleküle, die das Bindeglied darstellen könnten, bewiesen werden. Dennoch unterstützen die negativen Ergebnisse des Caspase-Versuches zusammen mit der nicht nachweisbaren Aktivierung des $G\alpha_{12/13}$ -Rho-Signaltransduktionsweges durch den $S1P_5$ -Rezeptor sowie der Tatsache, dass Rho-Aktivierung, die wir nicht beobachten konnten, zu Apoptose führen kann (Mills J.C., 1998, Takahashi et al., 1998; einen Überblick gibt Sah et al., 2000), die Aussage, dass die Effekte des $S1P_5$ -Rezeptors nicht $G\alpha_{12/13}$ -vermittelt sind. Es bleibt zu erwähnen, dass wir im Gegensatz zu den Untersuchungen von van Brocklyn et al. (1999) für den $rS1P_2$ -Rezeptor keine Anzeichen für Apoptose im Anschluss an das Abrunden der Zellen erkennen konnten. Dies kann u.a. auf das Verwenden verschiedener Zellarten - HEK293-Zellen in der Studie von van Brocklyn et al. versus CHO-K1-Zellen in den hier beschriebenen Untersuchungen - zurückzuführen sein. Wie von den Autoren festgestellt, lösen sich HEK293-Zellen deutlich leichter von den Zellkulturflaschen, und der beschriebene Verlust der Zelladhäsion kann ein Grund für den beobachteten Zelltod sein.

Befindet sich ein Rezeptor primär im endoplasmatischen Retikulum (ER), wird neben dem Motiv RSRR (R: Arginin, S: Serin), welches für ein Zurückhalten des Rezeptors im ER verantwortlich gemacht wird (Margeta-Mitrovic et al., 2000), auch noch eine falsche Faltung des Rezeptorproteins als Ursache in Betracht gezogen. Da der $S1P_5$ -Rezeptor das RSSR-Motiv nicht besitzt und eine relativ hohe intrazelluläre Lokalisation aufweist, musste zunächst befürchtet werden, dass das Protein falsch gefaltet und damit nicht funktionsfähig sein könnte. Interessanterweise sind Rezeptoren mit primär intrazellulärer Lokalisation dennoch in der Lage, eine Weiterleitung der Signale zu bewirken, wie für den $S1P_5$ -Rezeptor in der vorliegenden Arbeit in mehrfacher Hinsicht bewiesen wurde (u.a. cAMP-Hemmung, ERK-Phosphorylierung, $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung). Zwangsläufig stellt sich jedoch die Frage, inwieweit hierfür ein membranständiger Rezeptor vorhanden sein muss oder ob der internalisierte Rezeptor an der Signaltransduktion teilzunehmen in der Lage ist.

Nach der Stimulation von GPCRs werden Desensibilisierungsmechanismen eingeleitet, die eine unkontrollierte Signalweiterleitung durch den Rezeptor unterbinden sollen (Lohse et al., 1990; Vilardaga et al., 2002). Dies geschieht durch Phosphorylierung des Rezeptors durch spezielle Kinasen - meist im C-Terminus (siehe auch Abschnitt 1.1.1, Seite 5) – und die darauffolgende β -Arrestin-Bindung. Letzteres entkoppelt nicht nur den Rezeptor vom G-Protein, sondern bereitet ihn damit auch auf die Internalisierung mittels Clathrin-überzogener Partikel vor (einen Überblick gibt Ferguson et al., 2001). In letzter Zeit wurde jedoch an β_2 -Adrenozeptoren oder Opioidrezeptoren gezeigt, dass die Vermittlung gewisser Signale erst durch eine vorangehende Internalisierung initiiert wird. Daaka et al. (1998) und Ignatowa et al. (1999) konnten zeigen, dass die Internalisierung des Rezeptors erforderlich war, um eine ERK-Aktivierung zu induzieren. In diesen Versuchen wurde durch Verwendung dominant negativer

β -Arrestin- oder Dynamin-Mutanten eine Internalisierung der Rezeptoren verhindert und infolgedessen auch die ERK-Phosphorylierung unterbunden. Mit diesen Befunden im Hintergrund drängt sich die Frage auf, ob für die durch den S1P₅-Rezeptor-vermittelten, Ligand-unabhängigen Effekte zunächst eine Internalisierung vorausgehen muss oder ob die Internalisierung eine Konsequenz der konstitutiven Aktivität darstellt. Dieser Frage muss in weitergehenden Untersuchungen nachgegangen werden. Unabhängig von der Reihenfolge der zellulären Ereignisse unterstützen unsere Daten die Vorstellung, dass konstitutiv aktive Rezeptoren in erster Linie in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sind.

Wie Abbildung 46 (Seite 106) deutlich zeigt, befindet sich ein Großteil der S1P₅-Rezeptoren in intrazellulären Kompartimenten. Von S1P ist bekannt, dass es sowohl extrazellulär - also GPCR-vermittelt - als auch intrazellulär - hier ist das molekulare Zielprotein nicht identifiziert - seine Effekte ausüben kann (Spiegel & Milstien, 2000; Pyne & Pyne 2000b). In letzter Zeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Signaltransduktionskaskaden nicht nur von Plasmamembranen, sondern auch von nukleären Membranen ausgehen könnten (Malviya & Rouge 1998). Mehrere Studien haben gezeigt, dass die nukleäre Hülle eine entscheidende Rolle in den Signaltransduktionskaskaden spielt. Diese Vermutung wird als *nuclear-envelope-signal-transduction*-(NEST-)Hypothese in der Literatur beschrieben (Baldassare et al., 1997; Raben & Baldassare, 2000). Zusätzlich konnten sowohl heterotrimeren als auch kleine G-Proteine (Baldassare et al., 1997; Saffitz et al., 1994), Adenylatzyklase (Yamamoto et al., 1998), PLC (Malviya & Rouge., 1998; Cocco et al., 1999), PLD (Baldassare et al., 1997) und mehrere GPCRs wie der muskarinische M₃-Rezeptor (Lind et al., 1993), der Angiotensin-II-Rezeptor AT₂ (Booz et al., 1992) und die Prostaglandin-Rezeptoren EP₃ und EP₄ (Bhattacharya et al., 1999) im Zellkern nachgewiesen werden. Man ist daher versucht zu spekulieren, dass der S1P₅-Rezeptor eines der intrazellulären Proteine für S1P darstellen könnte.

Für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der konstitutiven Aktivität des S1P₅-Rezeptors wäre die Identifizierung eines inversen Agonisten von entscheidendem Vorteil. Um dies zu erreichen, könnte der von Welsby et al. (2002) beschriebene Weg von Nutzen sein. Er konnte mit Hilfe von G-Protein/Rezeptor-Fusions-Proteinen bei gleichzeitiger Inkubation mit RGS- (*regulator-of-G-Protein-signaling*-)Proteinen signifikant höhere basale GTPase-Aktivität messen und damit als Antagonisten bekannte Substanzen als inverse Agonisten identifizieren.

Welche physiologische Relevanz die konstitutive Aktivität des S1P₅-Rezeptors hat, bedarf noch intensiver Forschung. Es sei jedoch angemerkt, dass konstitutiv aktive GPCRs als Agonist-unabhängige Onkogene fungieren können (einen Überblick gibt Gutkind, 1997). Zusammen mit der Identifizierung von LPA als Tumormarker bei Ovarialkarzinom und evtl. weiteren Krebsarten könnten die S1P-Rezeptoren neben der kardiovaskulären Relevanz auch in der Onkologie eine Rolle spielen. Weiterhin wäre es denkbar, dass konstitutiv aktive Rezeptoren endogene und inverse Agonisten besitzen, die den Rezeptoraktivitätszustand modulieren können.

4.3 Ausblick

Nach der Identifizierung des fünften, humanen hochaffinen S1P-Rezeptors ist die Wahrscheinlichkeit, noch weitere Mitglieder dieser S1P/LPA-Familie zu identifizieren, sehr gering. Demgegenüber steht für das Verständnis der physiologischen/pathophysiologischen LPA- und S1P-Wirkungen der Forschung ein noch sehr weites Feld offen. Das Interesse an diesen Substanzen steigt stetig an, je mehr Teilergebnisse bekannt werden, umso komplexer wird das Gesamtbild.

Ein sehr wichtiges Ziel der Lipidforschung liegt in der Identifizierung von potenten und spezifischen Agonisten und Antagonisten für die jeweiligen Rezeptor Subtypen. Da unsere Daten darauf hinweisen, dass es auf dem Gebiet der bioaktiven Lipide evtl. keine weiteren Liganden für diese Rezeptorfamilie gibt, kann ein neuer Weg die chemische Modifizierung der S1P-Struktur sein. Erste Ansätze in diese Richtung sind von Im et al. (2001) beschrieben worden. Auch wenn diese dem S1P strukturell sehr nahen Komponenten keine sehr hohen Affinitäten zu den S1P-Rezeptoren aufweisen und auch nicht als rezeptorspezifisch angesehen werden können, geben diese Modifikationen jedoch Hinweise auf essentielle und sekundäre Strukturbestandteile. Zusätzliche Informationen bezüglich essentieller Strukturbestandteile liefert auch die Identifizierung von FTY720P als Ligand an den S1P-Rezeptoren (Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002). Die Phosphatgruppe spielt auch hier die entscheidende Rolle, so dass neue Substanzen diese oder vergleichbare Strukturbestandteile aufweisen sollten. Die Tatsache, dass der S1P₂-Rezeptor nicht auf FTY720P reagiert, könnte zum einen dazu genutzt werden, Effekte, die nicht durch FTY720P aber durch S1P induzierbar sind, diesem Rezeptor zuzuordnen. Es könnte aber auch ein Hinweis sein, dass evtl. Veränderungen am aromatischen Ring der Substanz, den S1P nicht besitzt, zu einer weiteren Selektivität für bestimmte Rezeptoren führen könnten.

Ein weiterer Ansatz, der zum besseren Verständnis der Bedeutung der Lipidrezeptoren beitragen wird, ist die Identifizierung von Polymorphismen in den jeweiligen für den Rezeptor kodierenden Genen bei Patientengruppen, die ein bestimmtes Krankheitsbild aufweisen. Derartige Studien werden zur Zeit bei kardiovaskulären Erkrankungen im Rahmen des Larcom-Projektes (Ludwigshafen Aventis Research cooperation on myocardial infarction) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien können vermutlich weitere Erkenntnisse zum Verständnis von Herz-Kreislaufkrankungen beisteuern.

Neben der Identifizierung von Polymorphismen in den Rezeptorgenen liefern auch Untersuchungen der Rezeptorexpression auf RNA- sowie auf Proteinebene in etablierten Tiermodellen wertvolle Hinweise für die Bedeutung der Rezeptoren. Können hier deutliche Unterschiede in den Expressionsniveaus bei gesunden und kranken Tieren festgestellt werden, liegt die Vermutung nahe, dass der Rezeptor eine Rolle in der Entstehung und

Entwicklung des jeweiligen pathologischen Zustandes spielt oder als Gegenreaktion des Körpers im Sinne einer schützenden Wirkung fungiert.

Durch unsere Untersuchungen am hS1P₅-Rezeptor sind neue Fragen aufgetaucht, die es zu adressieren gilt. Hierbei ist ein zentraler Punkt, in weiteren Untersuchungen die Relevanz der Expressionsunterschiede in Ratte und Menschen zu bestimmen. Erst dann können die in einem Tiermodell untersuchten S1P-Effekte zuverlässig interpretiert werden. Hier wäre die Entwicklung spezifischer S1P₅-Rezeptor-Agonisten von großem Wert, da so ein direkter Vergleich der ausschließlich durch den S1P₅-Rezeptor vermittelten Effekte in der Ratte und beim Menschen (zum Beispiel an isolierten Kardiomyozyten) möglich würde.

Eine weitere wichtiger, neuer Befund dieser Arbeit ist die konstitutive Aktivität des S1P₅-Rezeptors und die damit verbundene partielle intrazelluläre Lokalisation. Inwiefern die *in vitro* gemessene liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors auch *in vivo* eine Rolle spielt, kann zur Zeit noch nicht beurteilt werden. Die Tatsache, dass ein Rezeptor mit einer hohen prozentualen intrazellulären Lokalisation dennoch in der Lage ist, Signale zu vermitteln, kann das Verständnis der GPCR-Pharmakologie besonders in der industriellen Forschung erweitern. Wurden bisher Rezeptoren mit intrazellulärer Lokalisation, die keine strukturelle Prädisposition hierfür aufwiesen, häufig als nicht funktionell und missgefaltet betrachtet und nicht weiter untersucht, könnte hier in Zukunft vielleicht ein Umdenken erfolgen.

Wenngleich es bis zum kompletten Verständnis der LPA- und S1P-Wirkungen, der jeweils involvierten Rezeptoren, Kinasen und weiteren Proteine noch weiterer Forschungsarbeit bedarf - ein Teilstück wurde in den ersten Absätzen beschrieben - kann dennoch festgestellt werden, dass diese Lipide und ihre Rezeptoren in der Onkologie, der Herz-Kreislaufforschung (Atherosklerose, Angiogenese, Apoptose, Vasokonstriktion, Überladen der Zellen mit Ca²⁺) sowie dem neu hinzugekommenen Indikationsgebiet der Immunsuppression eine Rolle spielen. Ob sich daraus Möglichkeiten zur medikamentösen Behandlung ergeben, werden die nächsten Jahre zeigen.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von zwei neuen humanen S1P-Rezeptoren. Damit wird die Familie der S1P-Rezeptoren um einen hochaffinen und einen niedrig affinen Rezeptor erweitert. Die Untersuchungen der Expressionsprofile aller humanen S1P/LPA-Rezeptoren sowohl in Herz-Kreislauf-relevanten Geweben als auch in Endothelzellen und glatten Muskelzellen erfolgten bisher nicht im Sinne der hier dargestellten familienübergreifenden Betrachtung. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit erstmalig auch der hS1P₅-Rezeptor mit eingeschlossen. Wir konnten zeigen, dass zur Beurteilung der S1P- und LPA-Effekte in den untersuchten Gewebe- und Zellarten neben den bisher bekannten sieben Rezeptoren auch der hS1P₅-Rezeptor betrachtet werden muss. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da in bisherigen Untersuchungen insbesondere bei der Interpretation der S1P-Wirkungen nur die Rezeptoren S1P₁₋₃ berücksichtigt wurden.

In dieser Arbeit wurde außerdem zum ersten Mal eine große Anzahl potentieller Lipidliganden an den S1P-Rezeptoren S1P₁₋₃ und ₅ sowie am hGPR63 getestet. Auch wenn hierbei keine neuen Liganden identifiziert werden konnten, grenzen unsere Untersuchungen die Zahl potentieller zusätzlicher Liganden ein. Außerdem konnten wir zeigen, dass Suramin nicht – wie bisher vermutet – ein spezifischer Antagonist des S1P₃-Rezeptors ist, sondern auch S1P₅-Rezeptor-vermittelte Effekte blockieren kann. Hierdurch kann eine Fehlinterpretation von durch Suramin-hemmbareren Effekten verhindert werden.

Ein wichtiger Befund dieser Arbeit, insbesondere für die pharmazeutische Industrie, ist die speziespezifische Expression des S1P₅-Rezeptors. Während in der Ratte hauptsächlich eine Verteilung des Rezeptors im ZNS zu beobachten ist, findet sich das humane Homologe hauptsächlich in peripheren und hier insbesondere Herz-Kreislauf-relevanten Geweben. Der Einsatz von Tiermodellen, bei denen es sich in der Regel um Nager handelt, zur Untersuchung der S1P-Effekte muss daher kritisch überdacht werden, da in diesem Fall ein im Menschen potentiell relevanter Rezeptor nicht in den peripheren Geweben der Ratte vorhanden und somit nicht an den S1P-Wirkungen beteiligt ist. Zudem konnten wir auch funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Rezeptoren unterschiedlicher Spezies beobachten, was zusätzlich gegen die Verwendung von Tiermodellen zumindest bei Untersuchungen des S1P₅-Rezeptors spricht.

Neben der erstmaligen Charakterisierung der Signaltransduktionswege des S1P₅-Rezeptors konnte im Laufe dieser Arbeiten eine weitere neue Eigenschaft des S1P₅-Rezeptors festgestellt werden: Dieser ist in der Lage, ligand-unabhängige Effekte hervorzurufen. Dies ist von Bedeutung, da häufig Rezeptoren, die aufgrund von Mutationen konstitutiv aktiv sind, für die Ausbildung von Krankheiten verantwortlich sind.

Wir konnten darüberhinaus zeigen, dass der zweite in dieser Arbeit identifizierte S1P-Rezeptor, der *orphan*-hGPR63, von relativ hohen Konzentrationen an S1P sowie von doPA angeschaltet wird. Wenngleich die Affinität des hGPR63 zu doPA niedrig ist, ist dies jedoch der erste Rezeptor, der auf dieses Lipid reagiert. Welche physiologische Bedeutung diesem Rezeptor zukommt, ist noch völlig offen, die primäre Expression im Hirn weist jedoch auf eine zumindest partielle zentrale Wirkung hin.

Zusätzlich zu den molekularbiologischen Befunden können aus dieser Arbeit wichtige Informationen für das Screenen von GPCRs und hier insbesondere von Lipid-GPCRs abgeleitet werden. Allgemein gilt, dass der Auswahl des richtigen Versuchssystems im Hinblick auf die Fragestellung und das zu untersuchende Protein eine entscheidende Bedeutung zukommt. Während bei Rezeptoren mit einer restriktiven Gewebeverteilung die Suche nach einem geeigneten Zellsystem keine Schwierigkeiten bereitet, stellt dies das Hauptproblem in der Lipidforschung dar. Da es keine Säugerzellen gibt, die nicht auf S1P reagieren, muss jedes Versuchssystem erneut auf Eignung und optimale Zellart untersucht werden. So konnten in transient transfizierten CHO-K1-Zellen hintergrundfreie S1P-Signale im FLIPR-Versuch gemessen werden, während in den MAP-Kinase-Versuchen in CHO-K1-Zellen der hohe endogene Hintergrund das Versuchsfenster auf ein Minimum reduzierte. Während die Messung von LPA-Effekten in CHO-K1-Zellen mit der FLIPR-Technologie aufgrund der endogenen Signale nicht möglich ist, können LPA-Effekte in McARH7777-Zellen ohne störenden Hintergrund gemessen werden. In diesem Zellsystem ist wiederum die Messung von S1P nicht oder nur begrenzt möglich. Auch wenn diese Beispiele spezifisch für Lipidrezeptoren sind, lässt sich doch aus dieser Arbeit die Notwendigkeit ableiten, neben der richtigen Substanz-Bibliothek besonders bei der Suche nach Liganden für *orphan*-GPCRs das richtige zelluläre System einzusetzen.

6.2 Anhang B: Nukleotid- und Proteinsequenz des hGPR63

```

1  ATGGTCTTCT CGGCAGTGTT GACTGCGTTC CATACCGGGA CATCCAACAC
51  AACATTTGTC GTGTATGAAA ACACCTACAT GAATATTACA CTCCTCCAC
101  CATTCCAGCA TCCTGACCTC AGTCCATTGC TTAGATATAG TTTTGAAACC
151  ATGGCTCCCA CTGGTTTGAG TTCCTTGACC GTGAATAGTA CAGCTGTGCC
201  CACAACACCA GCAGCATTTA AGAGCCTAAA CTTGCCTCTT CAGATCACCC
251  TTTCTGCTAT AATGATATTC ATTCTGTTTG TGTCTTTTCT TGGGAACCTG
301  GTTGTTTGCC TCATGGTTTA CCAAAAAGCT GCCATGAGGT CTGCAATTAA
351  CATCTCCTT GCCAGCCTAG CTTTTCGAGA CATGTTGCTT GCAGTGTGA
401  ACATGCCCTT TGCCCTGGTA ACTATTCTTA CTACCCGATG GATTTTTGGG
451  AAATCTTCT GTAGGTATC TGCTATGTTT TTCTGGTTAT TTGTGATAGA
501  AGGAGTAGCC ATCCTGCTCA TCATTAGCAT AGATAGGTTT CTTATTATAG
551  TCCAGAGGCA GGATAAGCTA AACCCATATA GAGCTAAGGT TCTGATTGCA
601  GTTTCTTGGG CAACTTCCTT TTGTGTAGCT TTTCTTTAG CCGTAGGAAA
651  CCCCACCTG CAGATACCTT CCCGAGCTCC CCAGTGTGTG TTTGGGTACA
701  CAACCAATCC AGGCTACCAG GCTTATGTGA TTTTGATTTT TCTCATTCTT
751  TTCTTCATAC CCTTCCTGGT AATACTGTAC TCATTATGG GCATACTCAA
801  CACCCTTCGG CACAATGCCT TGAGGATCCA TAGCTACCCT GAAGGTATAT
851  GCCTCAGCCA GGCCAGCAA CTGGGTCTCA TGAGTCTGCA GAGACCTTTC
901  CAGATGAGCA TTGACATGGG CTTTAAAACA CGTGCCTTCA CCACTATTTT
951  GATTCTCTTT GCTGTCTTCA TTGTCTGCTG GGCCCCATTC ACCACTTACA
1001  GCCTTGGGC AACATTCAGT AAGCACTTTT ACTATCAGCA CAACTTTTTT
1051  GAGATTAGCA CCTGGCTACT GTGGCTCTGC TACCTCAAGT CTGCATTGAA
1101  TCCGCTGATC TACTACTGGA GGATTAAGAA ATTCCATGAT GCTTGCCTGG
1151  ACATGATGCC TAAGTCCTTC AAGTTTTTGC CGCAGCTCCC TGGTCACACA
1201  AAGCGACGGA TACGTCCTAG TGCTGTCTAT GTGTGTGGG AACATCGGAC
1251  GGTGGTGTGA

```

Nukleotidsequenz des hGPR63

MVFSAVLTAFHTGTSNTTFVYENTYMNITLPPPFQHPDLSPLLRYSFETMAPTGLSSLTVN
STAVPTTPAAFKSLNLPLQITLSAIMIFILFVSFLGNLVVCLMVYQKAAMRSAINILLASLAFAD
MLLAVLNMPFALVTILTTRWIFGKFFCRVSAMFFWLFVIEGVAILLIISIDRFLIIVQRQDKLNPY
RAKVLIASWATSFCVAFPLAVGNPDLQIPSRAPQCVFGYTTNPGYQAYVILISLISFFIPFLVI
LYSFMGILNLRHNALRIHSYPEGICLSQASKLGLMSLQRPFQMSIDMGFKTRAFTTILILFAV
FIVCWAPFTTYSLVATFSKHFYYQHNFFEISTWLLWLCYLKSALNPLIYYWRIKKFHDACLDM
MPKSFKFLPQLPGHTKRRIRPSAVYVCGEHRTVV

Proteinsequenz des hGPR63

6.3 Anhang C: Zusammensetzung der Lipid-Substanz-Bibliothek

Platte -well	Kat. #	Name	Endkonz. (μ M)	MW
1-B1	H005	5(S)-HETE	0.1	320.5
1-B2	HR005	(\pm)5-HETE	0.1	320.5
1-B3	HL005	(\pm)5-HETE LACTONE	0.1	302.5
1-B4	H008	8(S)-HETE	0.1	320.5
1-B5	H009	9(S)-HETE	0.1	320.5
1-B6	H011	11(S)-HETE	0.1	320.5
1-B7	H012	12(S)-HETE	0.1	320.5
1-B8	H112	12(R)-HETE	0.1	320.5
1-B9	H015	15(S)-HETE	0.1	320.5
1-B10	H215	15(S)-HEDE	0.1	320.5
1-B11	H305	(\pm)5-HETrE	0.1	320.5
1-B12	H312	TETRANOR-12(R)-HETE	0.1	324.5
1-C1	H315	15(S)-HETE	0.1	266.4
1-C2	HR505	(\pm)5-HEPE	0.1	318.5
1-C3	H515	15(S)-HEPE	0.1	318.5
1-C4	HP005	5(S)-HPETE	0.1	336.5
1-C5	HP012	12(S)-HPETE	0.1	336.5
1-C6	HP015	15(S)-HPETE	0.1	336.5
1-C7	HP125	15(S)-HPEDE	0.1	340.5
1-C8	HP515	15(S)-HPEPE	0.1	334.5
1-C9	HA004	(\pm)4-HYDROXYNON-2-ENAL	1	156.5
1-C10	HE008	HEPOXILIN A3	0.1	318.5
1-C11	HE010	HEPOXILIN B3	0.1	318.5
1-C12	D122	12(S),20-DIHETE	0.1	336.5
1-D1	D515	5(S),15(S)-DIHETE	0.1	336.5
1-D2	D815	8(S),15(S)-DIHETE	0.1	336.5
1-D3	DS056	5(S),6(R)-DIHETE	0.1	336.5
1-D4	DTR512	5(S),12(R)-DIHETE all trans	0.1	336.5
1-D5	DTR815	8(R),15(S)-DIHETE all trans	0.1	336.5
1-D6	DTS512	5(S),12(S)-DIHETE all trans	0.1	336.5
1-D7	DTS815	8(S),15(S)-DIHETE all trans	0.1	336.5
1-D8	EE56	5,6-EPOXYEICOSATRIENOIC ACID	0.1	320.5
1-D9	EE89	8,9-EPOXYEICOSATRIENOIC ACID	0.1	320.5
1-D10	EE11	11,12-EPOXYEICOSATRIENOIC ACID	0.1	320.5
1-D11	EE14	14,15-EPOXYEICOSATRIENOIC ACID	0.1	320.5
1-D12	K005	5-KETOEICOSATETRAENOIC ACID	0.1	318.5
1-E1	K015	15-KETOEICOSATETRAENOIC ACID	0.1	318.5
1-E2	KO013	13-KETOOCTADECADIENOIC ACID	0.1	294.5
1-E3	LB003	LEUKOTRIENE B3	0.1	338.5
1-E4	LB004	LEUKOTRIENE B4	0.1	336.5
1-E5	HLB004	20-HYDROXY-LEUKOTRIENE B4	0.1	352.5

Anhang

Platte -well	Kat. #	Name	Endkonz. (μ M)	MW
1-E6	CLB004	20-CARBOXY-LEUKOTRIENE B4	0.1	366.5
1-E7	LC004	LEUKOTRIENE C4	0.1	625.8
1-E8	LD004	LEUKOTRIENE D4	0.1	496.7
1-E9	LE004	LEUKOTRIENE E4	0.1	439.6
1-E10	LEA004	N-ACETYL-LEUKOTRIENE E4	0.1	481.7
1-E11	LXA004	LIPOXIN A4	0.1	352.5
1-E12	LXB004	LIPOXIN B4	0.1	352.5
1-F1	PG001	PROSTAGLANDIN A1	1	336.5
1-F2	PG002	PROSTAGLANDIN A2	1	334.5
1-F3	PG003	PROSTAGLANDIN B1	1	336.5
1-F4	PG004	PROSTAGLANDIN B2	1	334.5
1-F5	PG005	PROSTAGLANDIN D2	1	352.5
1-F6	PG006	PROSTAGLANDIN E1	1	354.5
1-F7	PG007	PROSTAGLANDIN E2	1	352.5
1-F8	PG008	PROSTAGLANDIN F2 α	1	354.5
1-F9	PG010	PROSTAGLANDIN F1 α	1	356.5
1-F10	PG011	PROSTAGLANDIN I2 Na	1	374.5
1-F11	PG013	15-KETO-PROSTAGLANDIN E2	1	350.5
1-F12	PG015	15-KETO-PROSTAGLANDIN F2 α	1	352.5
1-G1	PG016	13,14-DIHYDRO-15-KETO-PGF2 α	1	354.5
1-G2	PG017	6-KETO-PROSTAGLANDIN F1 α	1	370.5
1-G3	PG021	16,16-DIMETHYL-PROSTAGLANDIN E2	1	380.5
1-G4	PG023	U-46619	1	350.5
1-G5	PG030	9 β ,11 α PROSTAGLANDIN F2	1	354.5
1-G6	PG031	9 α ,11 β PROSTAGLANDIN F2	1	354.5
1-G7	PG033	PROSTAGLANDIN J2	1	334.5
1-G8	PG034	2,3-DINOR-6-KETO-PGF1 α	0.1	342.5
1-G9	PG035	CARBACYCLIN	1	350.5
1-G10	PG036	(\pm)13-AZAPROSTANOIC ACID	1	311.5
1-G11	PG038	19(R)-HYDROXY-PROSTAGLANDIN E2	1	368.5
1-G12	PG039	19(R)-HYDROXY-PROSTAGLANDIN F2 α	0.1	370.5
2-B1	PG042	17-PHENYL-TRINOR-PGE2	1	386.5
2-B2	PG047	Δ 12-PROSTAGLANDIN J2	1	334.5
2-B3	PG048	13,14-DIHYDRO-PGE1	1	356.5
2-B4	PG049	8-EPI-PROSTAGLANDIN F2 α	1	354.5
2-B5	PG050	15d-PGJ2	1	316.5
2-B6	PG052	MISOPROSTOL, FREE ACID	1	368.5
2-B7	TB002	THROMBOXANE B2	1	370.5
2-B8	TB004	11-DEHYDRO-THROMBOXANE B2	1	368.5
2-B9	FA017	ANANDAMIDE (20:4, n-6)	1	347.6
2-B10	FA018	PALMITYLETHANOLAMIDE	1	299.5
2-B11	FA026	ANANDAMIDE (18:2,n-6)	1	323.6
2-B12	FA019	ANANDAMIDE (20:3,n-6)	1	349.6
2-C1	FA020	ANANDAMIDE (22:4,n-6)	1	375.6
2-C2	FA027	MEAD ETHANOLAMIDE	1	349.6
2-C3	FA021	(R)-METHANANDAMIDE	1	361.6

Anhang

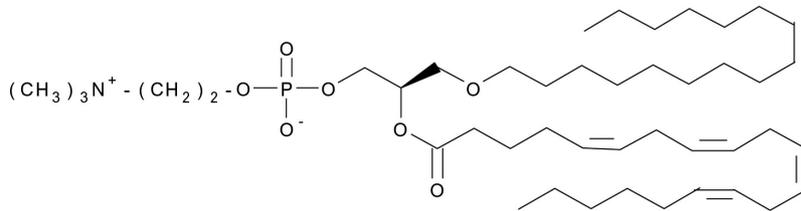
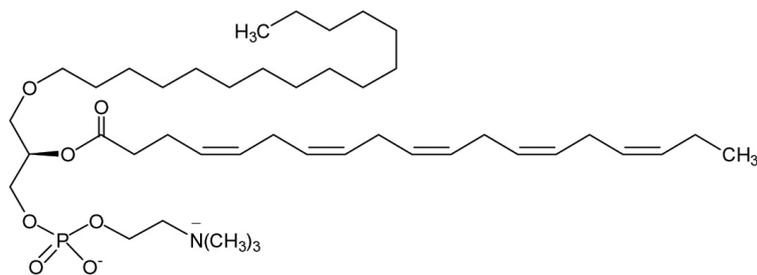
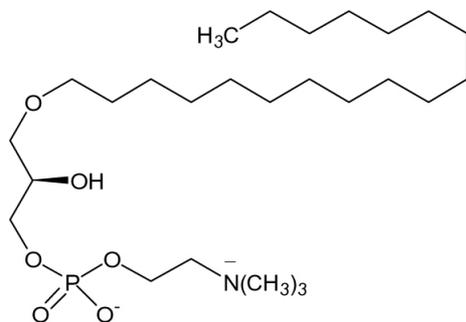
Platte -well	Kat. #	Name	Endkonz. (μ M)	MW
2-C4	CR104	BML-190	1	426.9
2-C5	FA029	N-ARACHIDONOYLGLYCINE	1	361.5
2-C6	L126	TETRAHYDROCANNABINOL-7-OIC ACID	1	344.4
2-C7	CR105	WIN 55,212-2	1	522.6
2-C8	FA022	ARACHIDONAMIDE	1	303.5
2-C9	FA023	LINOLEAMIDE	1	279.5
2-C10	FA025	9,10-OCTADECENOAMIDE	1	281.5
2-C11	G200	ACETYL-FARNESYL-CYSTEINE	1	367.5
2-C12	G201	S-FARNESYL-L-CYSTEINE ME	1	339.5
2-D1	G220	AGGC	1	435.7
2-D2	G221	AGC	1	299.4
2-D3	G222	FARNESYLTHIOACETIC ACID	1	296.5
2-D4	HO409	9(S)-HODE	0.1	296.5
2-D5	HO309	(\pm)9-HODE	0.1	296.5
2-D6	HO013	13(S)-HODE	0.1	296.5
2-D7	HR013	(\pm)13-HODE	0.1	296.5
2-D8	HO313	13(S)-HOTE	0.1	294.5
2-D9	HP019	9(S)-HPODE	0.1	312.5
2-D10	HP013	13(S)-HPODE	0.1	312.5
2-D11	LE009	LEUKOTOXIN A (9,10-EODE)	0.1	296.5
2-D12	LE012	LEUKOTOXIN B (12,13-EODE)	0.1	296.5
2-E1	HRT012	12(S)-HHT	0.1	280.4
2-E2	DM100	25-HYDROXYVITAMIN D3	1	400.6
2-E3	DM200	1,25-DIHYDROXYVITAMIN D3	1	416.6
2-E4	DM300	24,25-DIHYDROXYVITAMIN D3	1	416.6
2-E5	GR100	RETINOIC ACID, ALL TRANS	1	300.4
2-E6	GR101	9-CIS RETINOIC ACID	1	300.4
2-E7	GR102	13-CIS RETINOIC ACID	1	300.4
2-E8	GR103	4-HYDROXYPHENYLRETINAMIDE	1	391.5
2-E9	GR104	AM-580	1	351.4
2-E10	GR105	TTNPB	1	348.5
2-E11	GR106	METHOPRENE ACID	1	268.4
2-E12	GR200	WY-14643	1	323.8
2-F1	GR205	CIGLITAZONE	1	333.5
2-F2	EI160	CLOFIBRATE	1	242.7
2-F3	ET003	5,8,11-EICOSATRIYNOIC ACID	1	300.4
2-F4	ET004	5,8,11,14-EICOSATETRAYNOIC ACID	1	296.5
2-F5	DG100	1,2-DIDECANOYL-GLYCEROL (10:0)	1	400.6
2-F6	DG112	1,2-DIOCTANOYL-SN-GLYCEROL	1	344.5
2-F7	DG115	1,2-DIOLEOYL-GLYCEROL (18:1)	1	621
2-F8	DG125	1-OLEOYL-2-ACETYL-GLYCEROL	1	398.6
2-F9	DG130	1-STEAROYL-2-ARACHIDONOYL-GLYCEROL	1	645
2-F10	DG135	1-STEAROYL- 2-LINOLEOYL-GLYCEROL	1	621
2-F11	DG140	1-HEXADECYL-2-ARACHIDONOYL-GLYCEROL	1	603
2-F12	EI149	1-HEXADECYL-2-O-METHYL-GLYCEROL	1	330.6
2-G1	EI150	1-HEXADECYL-2-O-ACETYL-GLYCEROL	1	358.6
2-G2	TB005	2,3-DINOR-THROMBOXANE B2	0.1	342.4
2-G3	LB014	14,15-DEHYDRO-LEUKOTRIENE B4	0.1	334.5

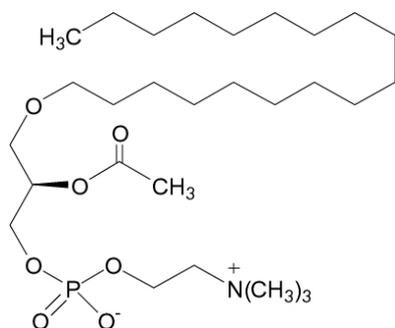
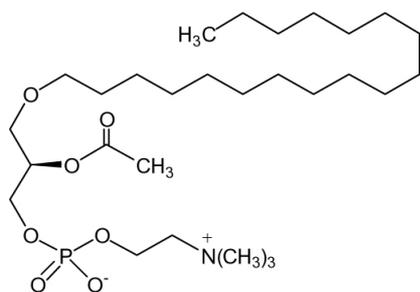
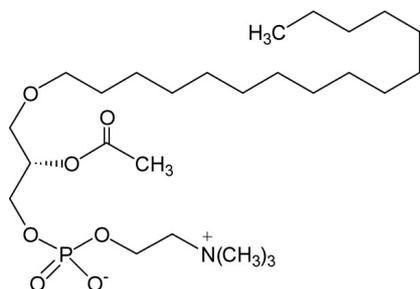
Anhang

Platte -well	Kat. #	Name	Endkonz. (μ M)	MW
2-G4	EI209	REV-5901	1	335.4
2-G5	RA101	LY-171883	1	318.4
2-G6	RA102	U-75302	0.1	361.5
2-G7	RA103	SQ-29548	1	387.5
2-G8	RA105	FLUPROSTENOL	1	458.5
2-G9	RA106	CLOPROSTENOL Na	1	446.9
3-B1	FA001	EICOSAPENTAENOIC ACID (20:5 n-3)	1	302.5
3-B2	FA002	DOCOSAHEXAENOIC ACID (22:6 n-3)	1	328.5
3-B3	FA003	ARACHIDONIC ACID (20:4 n-6)	1	304.5
3-B4	FA004	MEAD ACID (20:3 n-9)	1	306.5
3-B5	FA005	LINOLENIC ACID (18:3 n-3)	1	278.4
3-B6	FA006	GAMMA-LINOLENIC ACID (18:3 n-6)	1	278.4
3-B7	FA024	EICOSA-5,8-DIENOIC ACID (20:2 n-12)	1	308.5
3-B8	FA007	EICOSADIENOIC ACID (20:2 n-6)	1	308.5
3-B9	EI112	7,7-DIMETHYLEICOSADIENOIC ACID	1	336.6
3-B10	FA008	EICOSATRIENOIC ACID (20:3 n-3)	1	306.5
3-B11	FA009	DIHOMO-GAMMA-LINOLENIC ACID	1	306.5
3-B12	FA010	DOCOSATRIENOIC ACID (22:3 n-3)	1	336.5
3-C1	FA011	ADRENIC ACID (22:4 n-6)	1	332.5
3-C2	FA012	DOCOSAPENTAENOIC ACID	1	330.5
3-C3	FA014	LINOLEIC ACID	1	280.4
3-C4	EI103	17-OCTADECYNOIC ACID	1	280.4
3-C5	G230	2-HYDROXYMYRISTIC ACID	1	244.4
3-C6	G231	2-FLUOROPALMITIC ACID	1	274.4
3-C7	G232	4-OXATETRADECANOIC ACID	1	230.4
3-C8	G234	12-METHOXYDODECANOIC ACID	1	230.4
3-C9	EI155	SPHINGOSINE	1	299.5
3-C10	SL100	C2 CERAMIDE	1	341.5
3-C11	SL101	C2 DIHYDROCERAMIDE	1	343.5
3-C12	SL105	N,N-DIMETHYLSPHINGOSINE	1	327.6
3-D1	SL112	C8 CERAMIDE	1	425.7
3-D2	SL113	C8 DIHYDROCERAMIDE	1	427.7
3-D3	SL115	C16 CERAMIDE	1	537.9
3-D4	SL125	DIHYDROSPHINGOSINE	1	301.5
3-D5	SL135	SPHINGOMYELIN	1	731.1
3-D6	SL140	SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE	1	379.5
3-D7	SL141	SPHINGOSYLPHOSPHORYL CHOLINE	1	464.6
3-D8	SL143	DIHYDROSPHINGOSINE-1-PHOSPHATE	1	381.5
3-D9	SL145	C8 CERAMINE	1	411.7
3-D10	SL205	DL-DIHYDROSPHINGOSINE	1	301.5
3-D11	SL210	DL-PDMP	1	427.1
3-D12	SL215	DL-PPMP	1	510.7
3-E1	SL221	MAPP, D-erythro	1	361.6
3-E2	SL222	MAPP, L-erythro	1	361.6
3-E3	L100	PAF C16	1	523.7
3-E4	L101	LYSO-PAF C16	1	481.7
3-E5	L105	PAF C18	1	551.8

Anhang

Platte -well	Kat. #	Name	Endkonz. (μ M)	MW
3-E6	L128	LYSO-PAF C18	1	509.7
3-E7	L107	PAF C18:1	1	549.6
3-E8	L110	ENANTIO-PAF C16	1	523.7
3-E9	L102	ARACHIDONOYL-PAF	1	768.2
3-E10	L115	2-EPA-PAF	1	523.7
3-E11	L116	2-DHLA-PAF	1	770.2
3-E12	L117	DCHA-PAF	1	792.2
3-F1	L106	1-HEXADECYL-2-METHYLGLYCERO-3 PC	1	495.7
3-F2	L108	1-OCTADECYL-2-METHYLGLYCERO-3 PC	1	523.7
3-F3	L120	C-PAF	1	538.7
3-F4	L134	1-ACYL-PAF	1	537.7
3-F5	LP100	LYSOPHOSPHATIDIC ACID	1	458.5
3-F6	LP101	L-NASPA	1	423.5
3-F7	LP103	PHOSPHATIDIC ACID, DIPALMITOYL	1	670.9
3-F8	CR108	AM-251	1	555.2
3-F9	FA028	2-ARACHIDONOYLGLYCEROL	1	378.6
3-F10	GR206	6-FORMYLINDOLO [3,2-B] CARBAZOLE	1	284.3
3-F11	GR207	DIINDOLYLMETHANE	1	246.3
3-F12	FA030	N-LINOLEOYLGLYCINE	1	337.5

6.4 Anhang D: Strukturformeln ausgewählter Lipide**2-AA-PAF****2-EPA-PAF****Lyso-PAF C18**

PAF-C18:1**C-PAF****Enantio-PAF**

6.5 **Anhang E: Massenspektren ausgewählter Lipide nach HPLC-Analyse**

Dargestellt sind die jeweiligen Massenspektren der Lipide nach Auftrennung mittels HPLC. Für jedes Lipid sind die Spektren der separat erworbenen Einzelsubstanz sowie der Substanz-Bibliotheksubstanzen dargestellt.

Für jedes Lipid wurde sowohl ein ESI⁻ (hierbei wird deprotoniert, also M_r-1 (Molekülmasse-1) gebildet), sowie ein ESI⁺ (hier lagert sich H^+ und in kleinem Maße NH_4^{++} oder Na^+ an das Molekül an) Spektrum aufgenommen.

Alle Substanz-Bibliotheksubstanzen wurden in DMSO gelöst untersucht; die Einzelsubstanzen wurden in Ethanol oder Methanol gelöst eingesetzt.

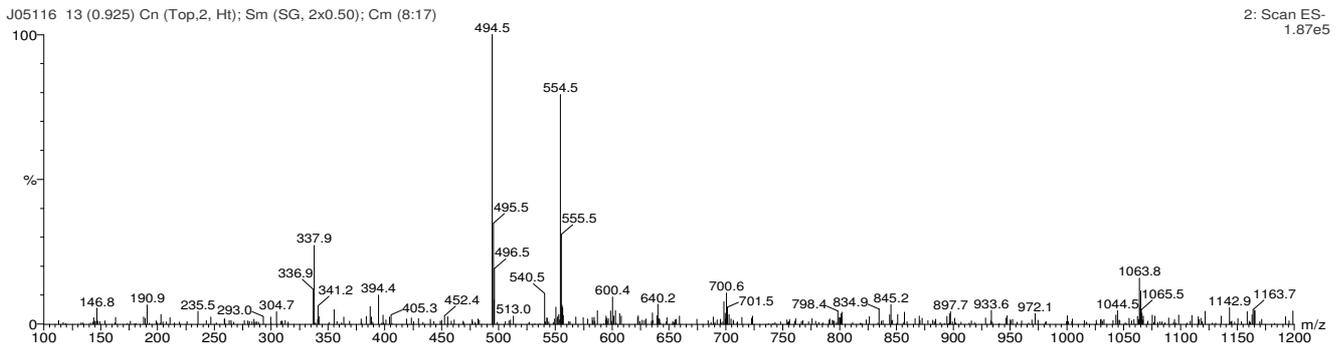
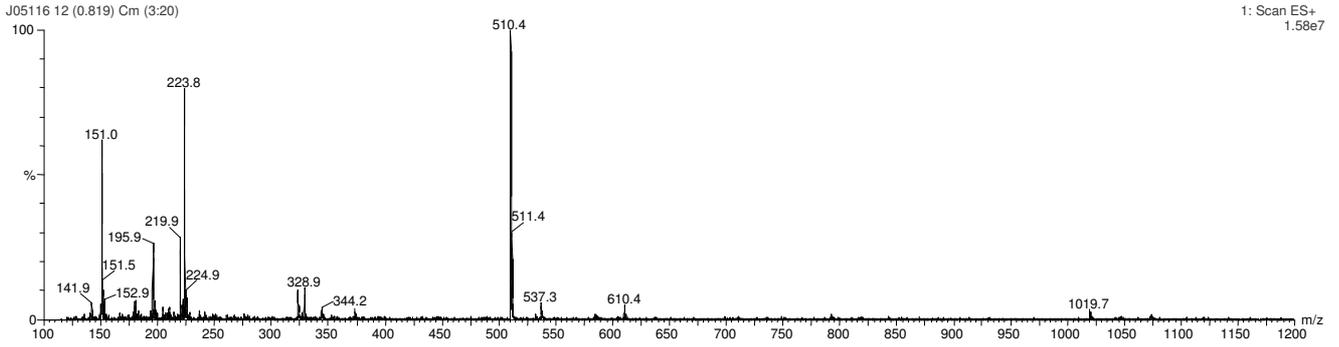
Erläuterung der Peaks:

ESI⁺ Spektrum bei: $Mr_{DMSO} + 1 = 150,95$
 $Mr_{Lipid} + 1 = \text{Substanzpeak}$
 $Mr_{Lipid} + 16 = \text{Substanz} + OH$ (1. Oxidation)
 $Mr_{Lipid} + 32 = \text{Substanz} + OOH$ (Peroxid)
 $Mr_{Lipid} + 64 = \text{Substanz} + 2 \times OOH$ (2 Peroxide)
etc.

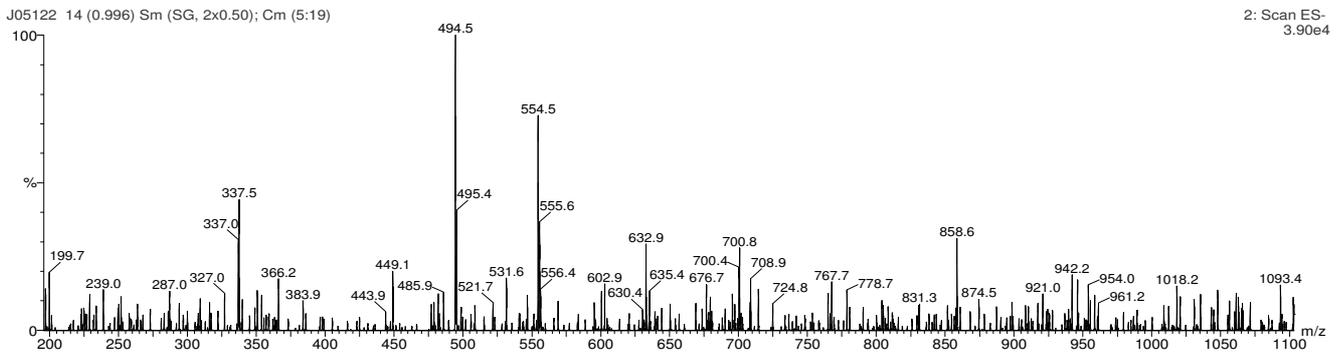
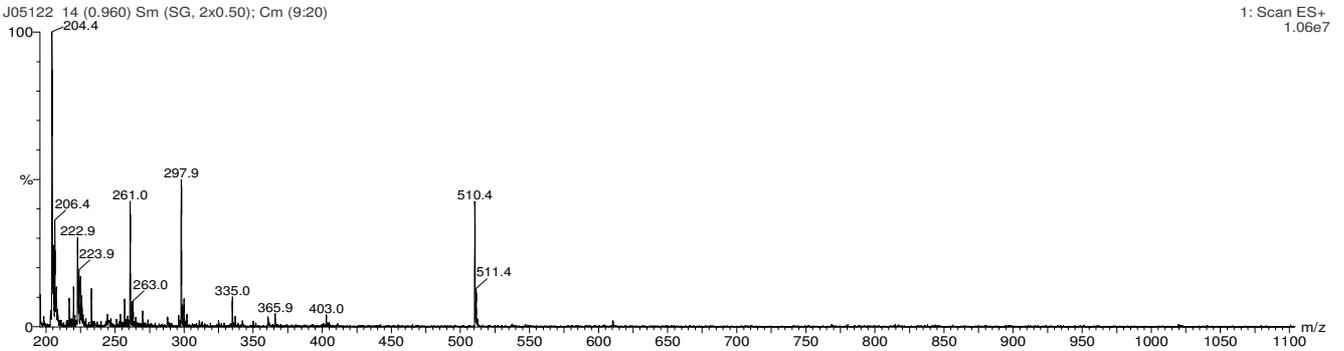
ESI⁻ Spektrum bei: $Mr_{Lipid} + 56 = \text{Substanz} + HCO_2^-$ (aus Ameisensäure; Lösungsmittel)
 $Mr_{Lipid} - 13 = \text{Substanz} - CH_3$

Deutliche Zersetzungen sind bei den Einzelsubstanzen sowie den Substanz-Bibliotheksubstanzen 2-EPA-PAF und 2-AA-PAF zu erkennen, wobei in den Einzelsubstanzen eine Zersetzung bis zu 80% stattgefunden hat. Bei Enantio-PAF und Lyso-PAF C18:1 kommen in den Substanz-Bibliotheksubstanzen mehr Zersetzungsprodukte vor; die Lipide PAF C18:1 sowie C-PAF sind sowohl als Einzelsubstanz als auch als Substanz-Bibliotheksubstanz unzersetzt.

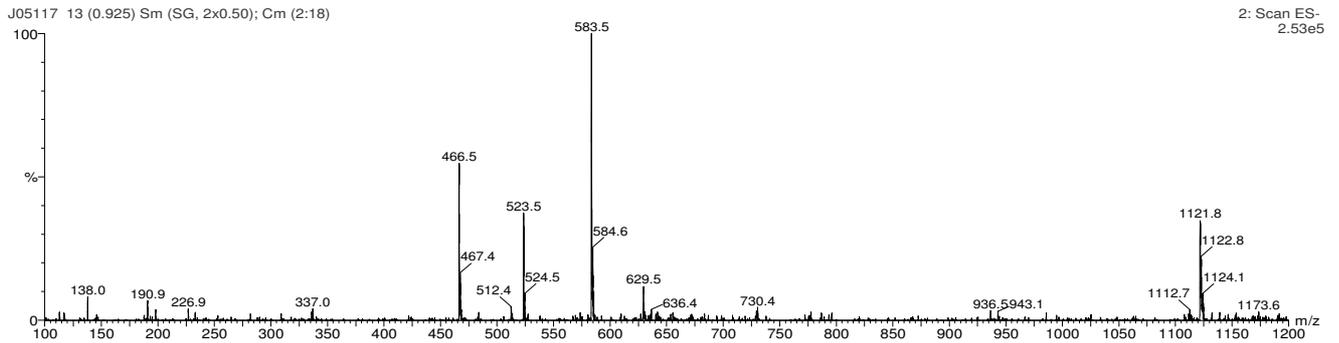
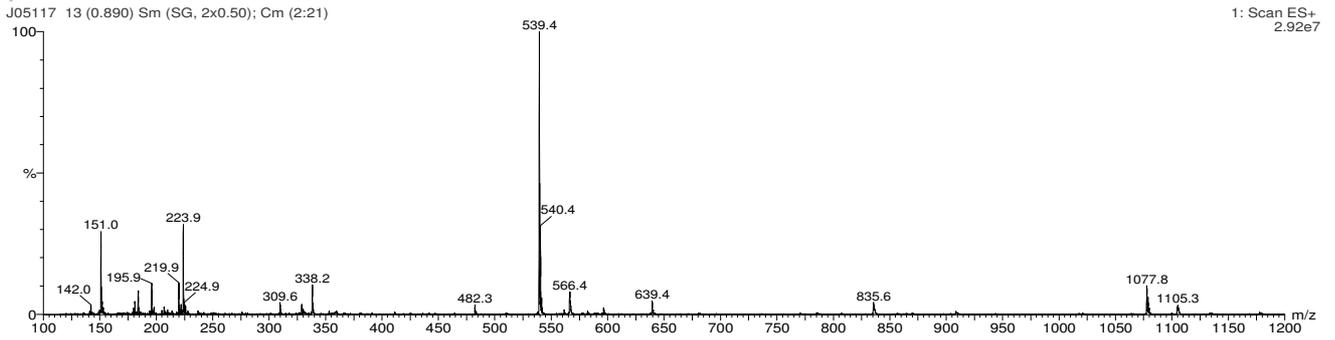
Lyso-PAF C18:1, Einzelsubstanz (Mr: 509,7)



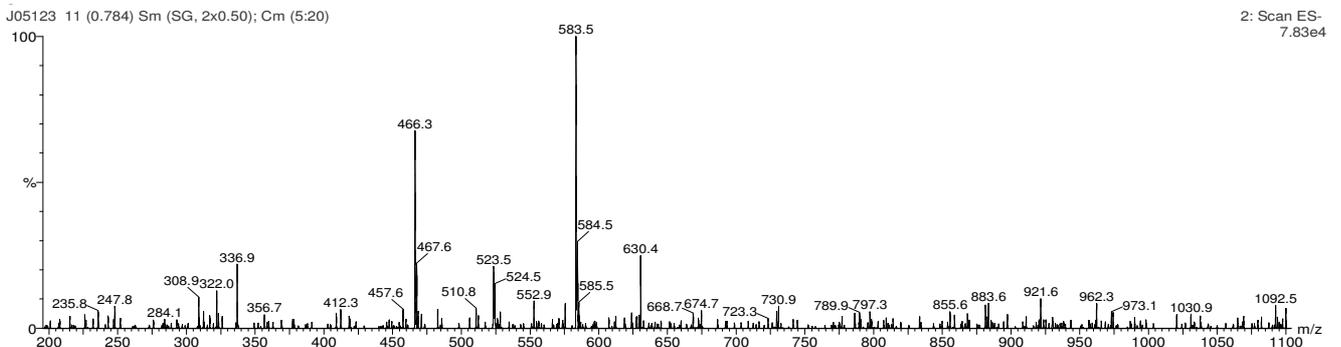
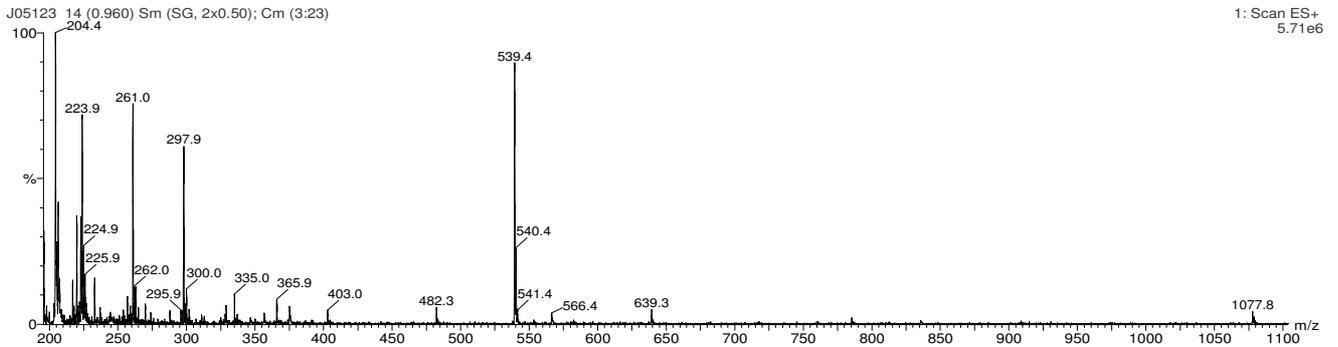
Lyso-PAF C18:1, Substanzbibliotheksubstanz



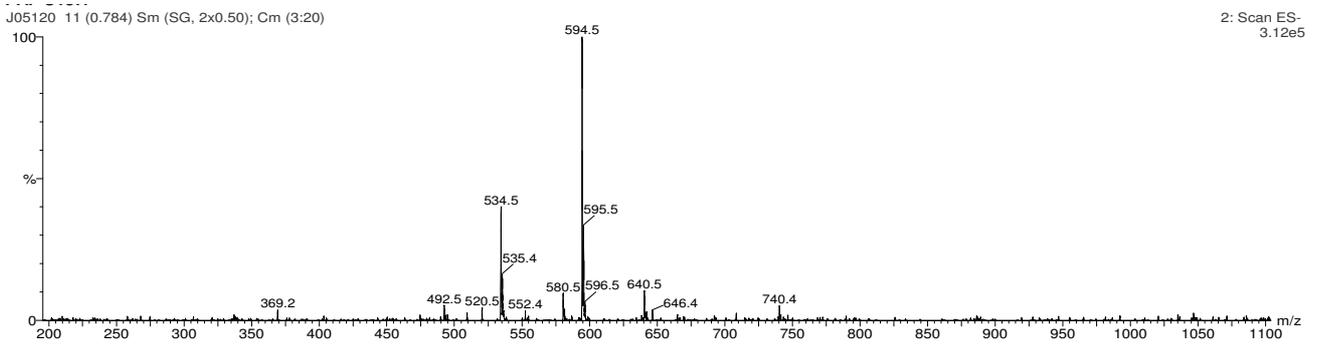
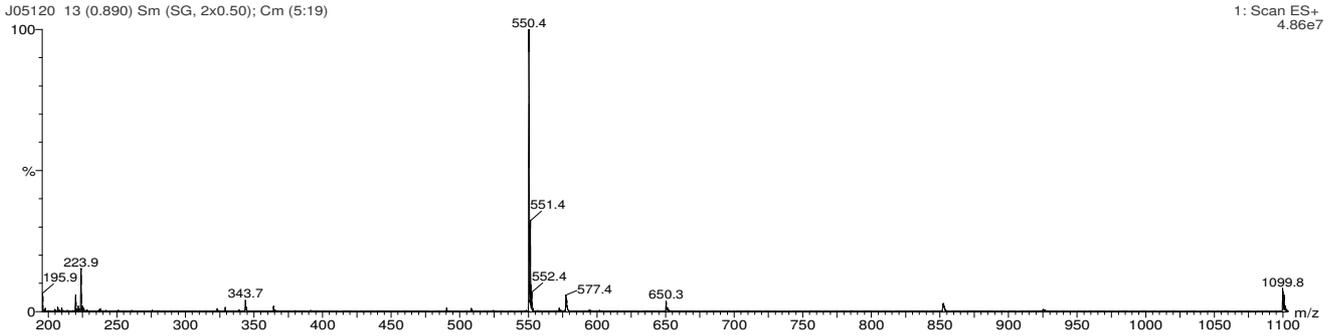
C-PAF, Einzelsubstanz (Mr: 538,7)



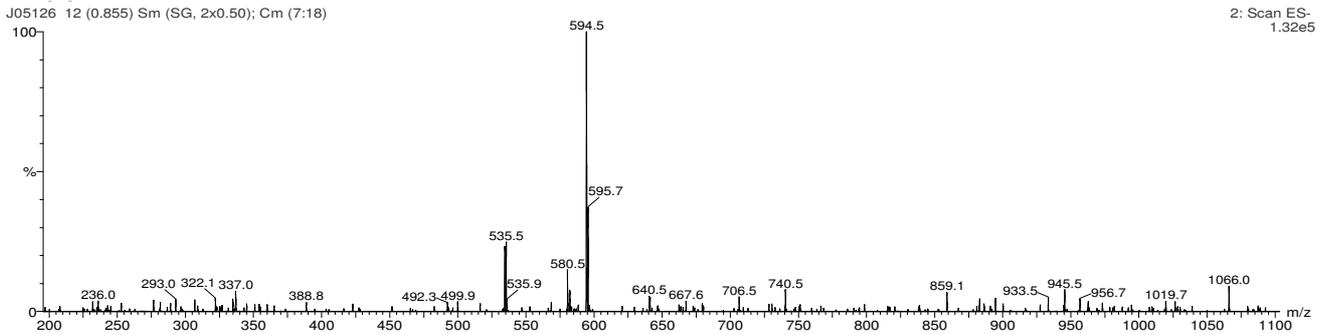
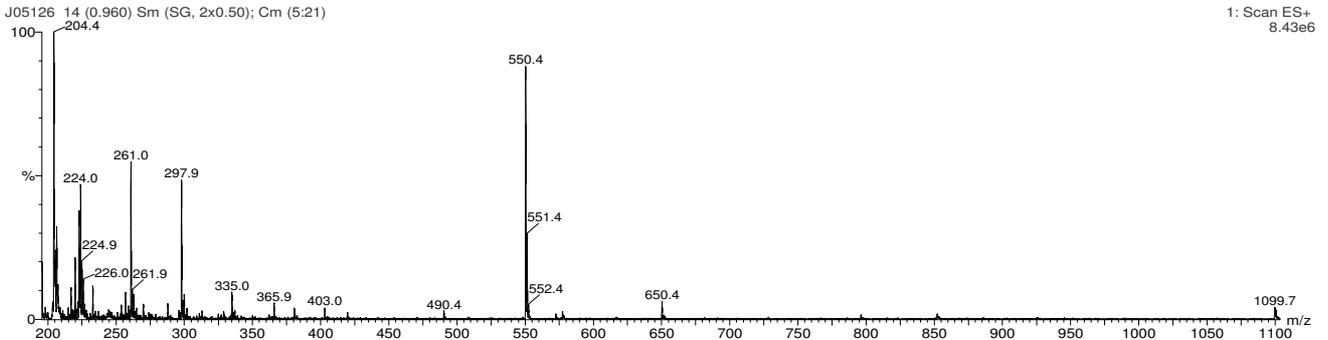
C-PAF, Substanzbibliotheksubstanz



PAF-C18:1, Einzelsubstanz (Mr: 549,3)



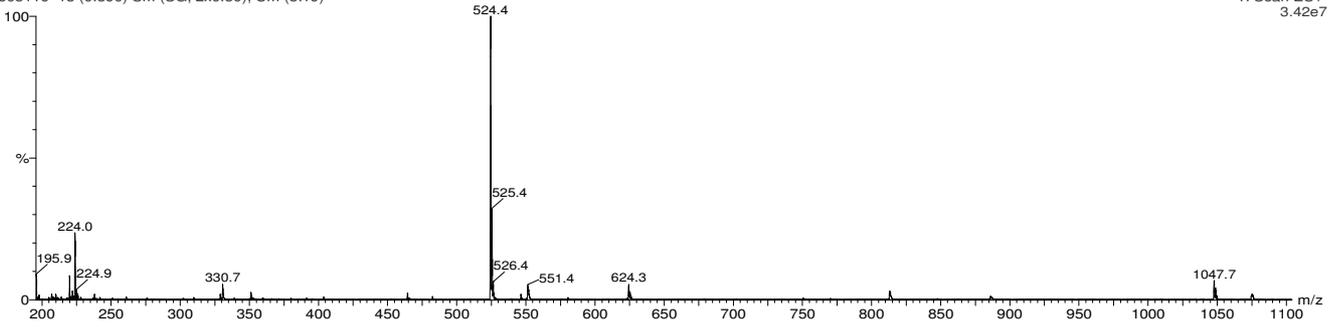
PAF-C18:1, Substanzbibliotheksubstanz



Enantio-PAF, Einzelsubstanz (Mr: 523,7)

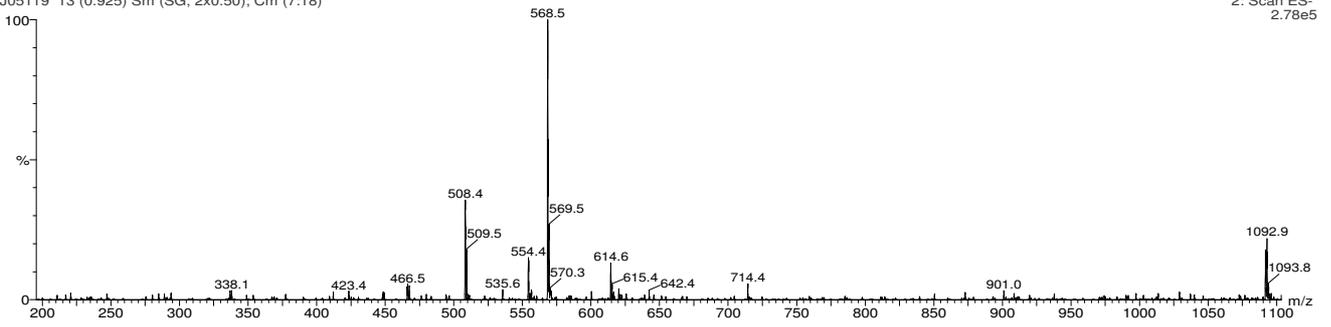
J05119 13 (0.890) Sm (SG, 2x0.50); Cm (8:19)

1: Scan ES+
3.42e7



J05119 13 (0.925) Sm (SG, 2x0.50); Cm (7:18)

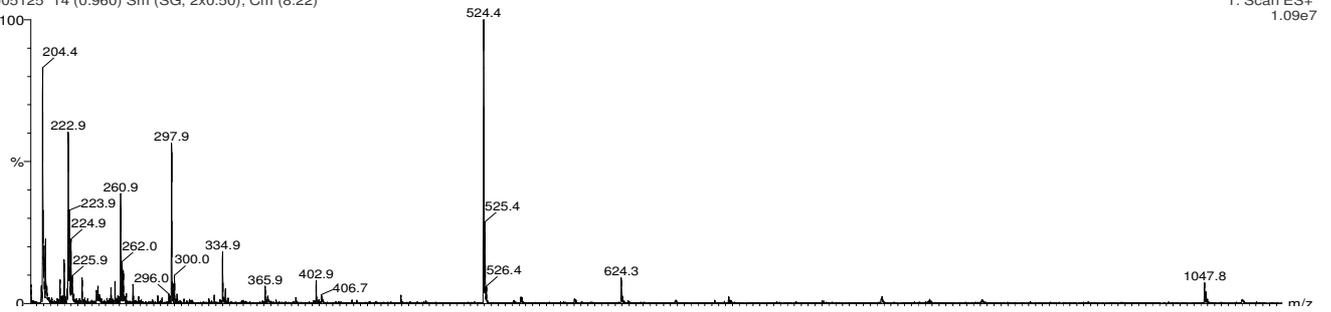
2: Scan ES-
2.78e5



Enantio-PAF, Substanzbibliotheksubstanz

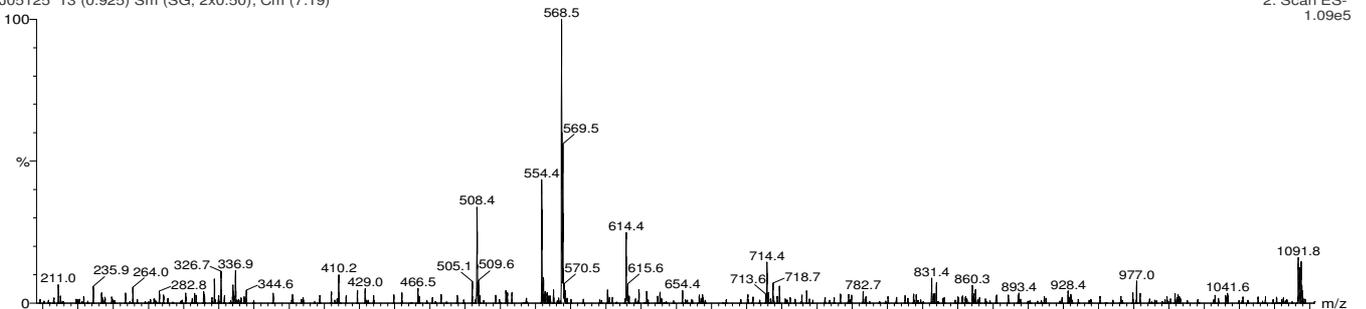
J05125 14 (0.960) Sm (SG, 2x0.50); Cm (8:22)

1: Scan ES+
1.09e7



J05125 13 (0.925) Sm (SG, 2x0.50); Cm (7:19)

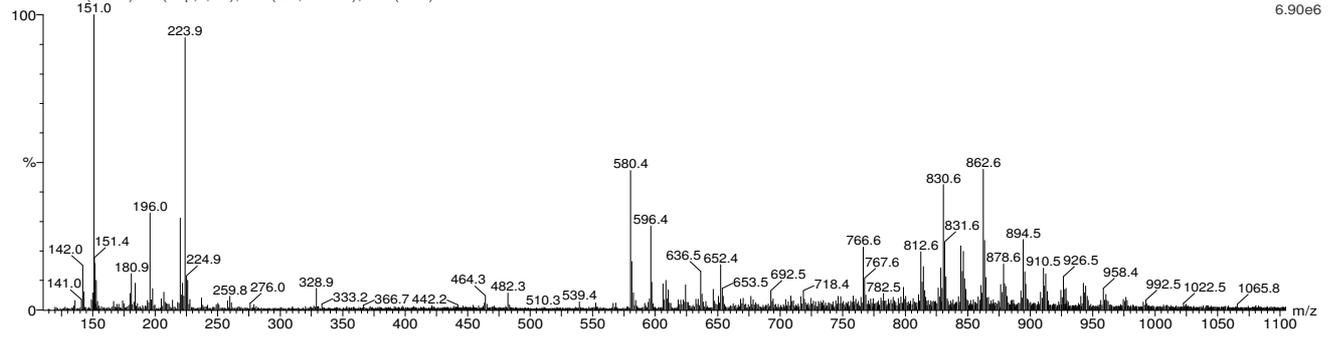
2: Scan ES-
1.09e5



2-EPA-PAF, Einzelsubstanz (Mr: 766,2)

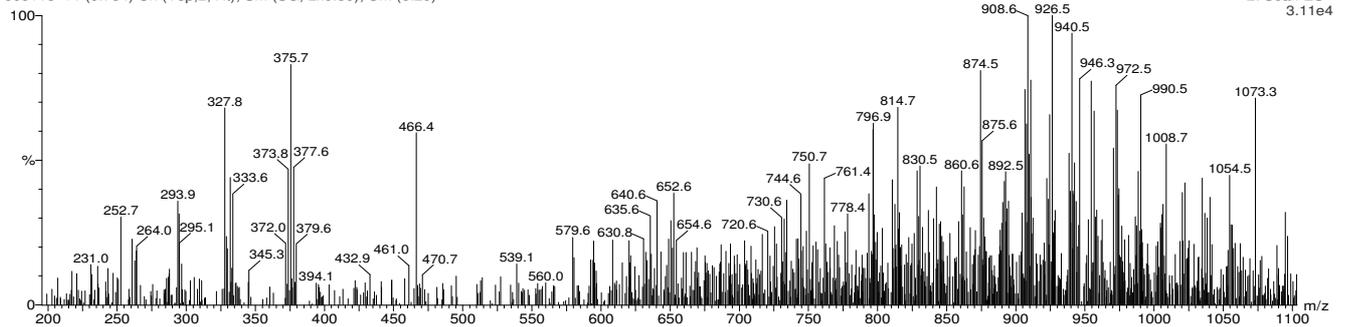
J05118 12 (0.819) Cn (Top,2, Ht); Sm (SG, 2x0.50); Cm (3:25)

1: Scan ES+
6.90e6



J05118 11 (0.784) Cn (Top,2, Ht); Sm (SG, 2x0.50); Cm (6:20)

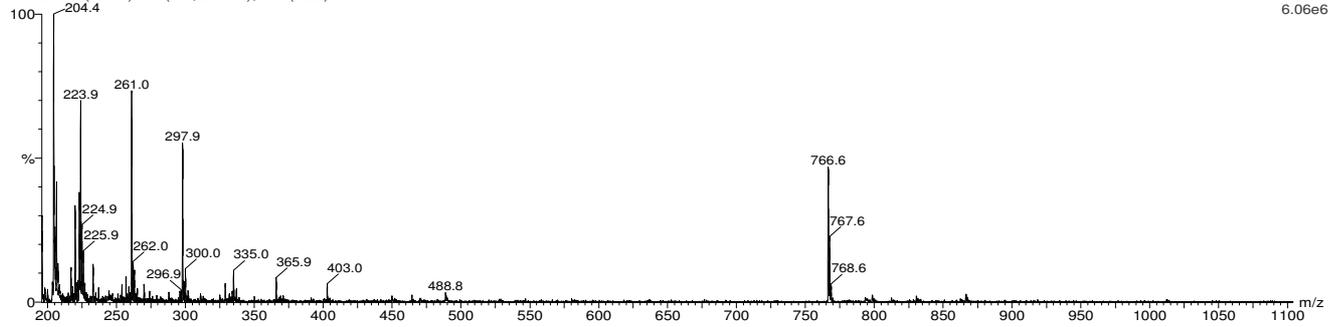
2: Scan ES-
3.11e4



2-EPA-PAF, Substanzbibliotheksubstanz

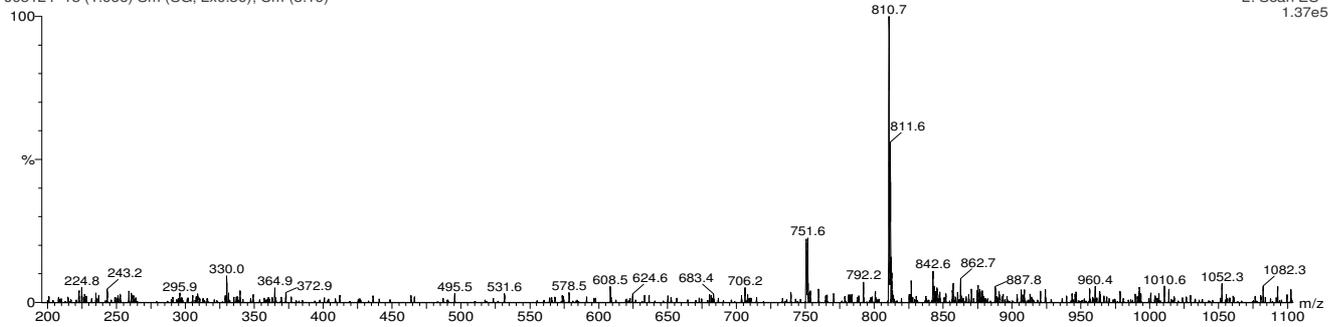
J05124 14 (0.960) Sm (SG, 2x0.50); Cm (3:22)

1: Scan ES+
6.06e6



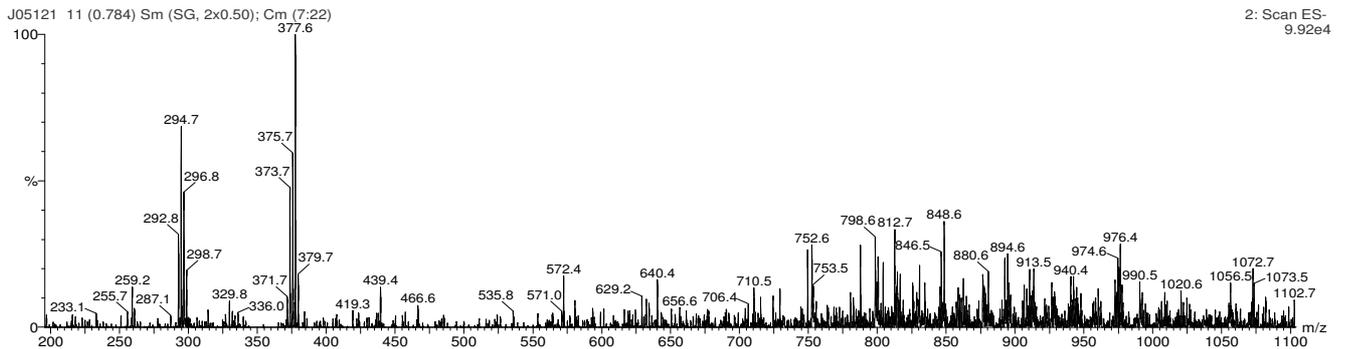
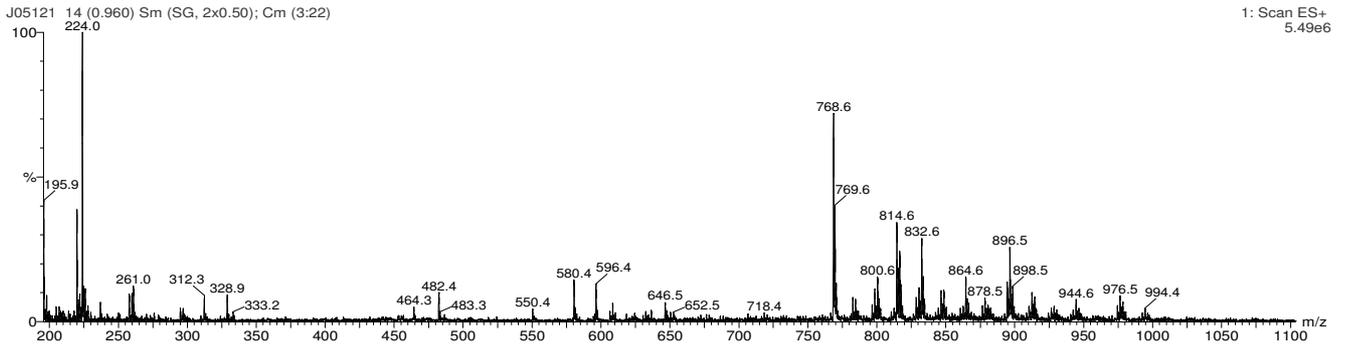
J05124 15 (1.066) Sm (SG, 2x0.50); Cm (8:19)

2: Scan ES-
1.37e5

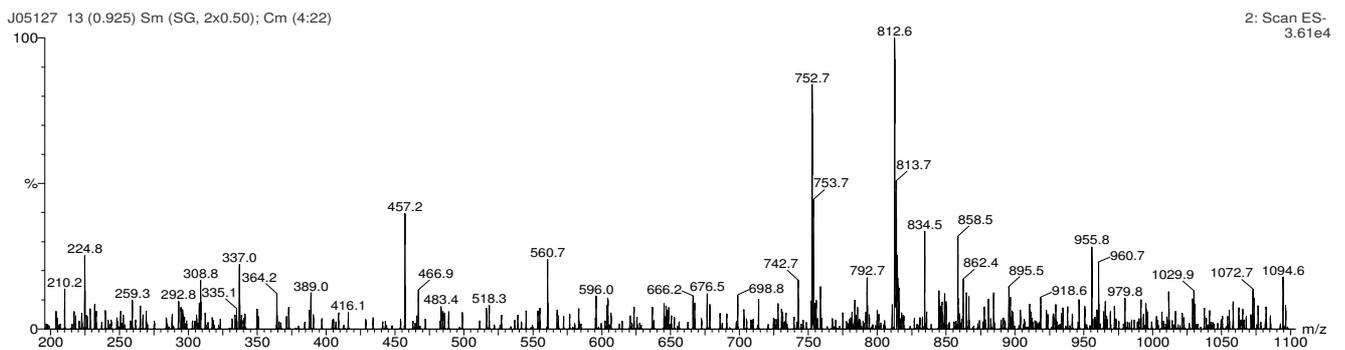
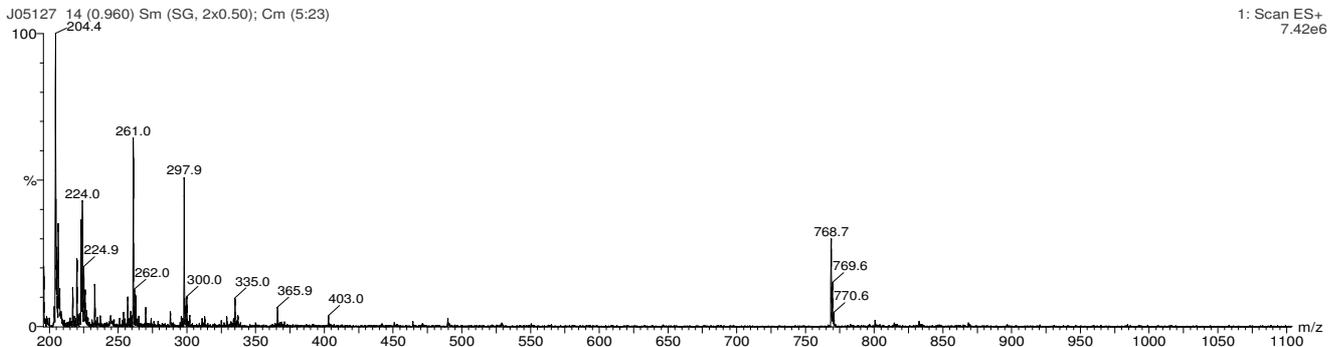


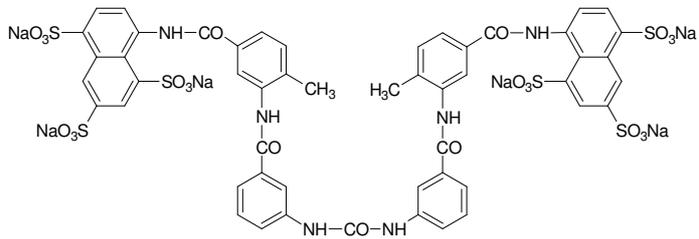
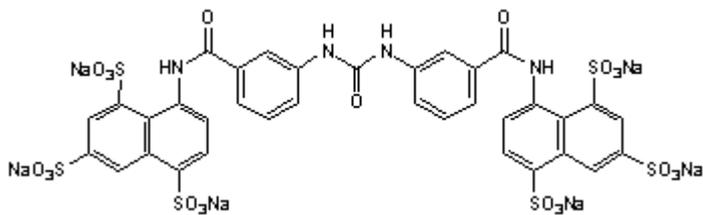
Anhang

2-AA-PAF, Einzelsubstanz (Mr: 768,2)



2-AA-PAF, Substanzbibliotheksubstanz



6.6 Anhang F: Strukturformeln von Suramin und NF023**Suramin (Natriumsalz)****NF023 (Natriumsalz)**

7 Literaturverzeichnis

- Alderton F, Sambhi B, Tate R, Pyne NJ, Pyne S. (2001). Assessment of agonism at G-protein coupled receptors by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid in human embryonic kidney 293 cells. *Br J Pharmacol* **134**:6-9.
- An S, Bleu T, and Zheng Y. (1999). Transduction of intracellular calcium signals through G-Protein-mediated activation of phospholipase C by recombinant sphingosine 1-phosphate receptors. *Mol Pharmacol* **55**:787-794.
- An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. (1998). Characterization of a novel subtype of human G-Protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Biol Chem* **273**:7906-7910.
- An S, Zheng Y, Bleu T. (2000). Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G-Protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J Biol Chem* **275**:288-296.
- Ancellin N, Hla T. (1999). Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *J Biol Chem* **274**:18997-19002.
- Andersson M, Sjostrand J, Petersen A, Honarvar AK, Karlsson JO. (2000). Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:2623-2632.
- Auge N, Nikolova-Karakashian M, Carpentier S, Parthasarathy S, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Merrill AH Jr, Levade T. (1999). Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. *J Biol Chem* **274**:21533-21538
- Baldassare JJ, Jarpe M, Alferes L, Raben DM. (1997). Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction. *J Biol Chem* **272**:4911-4914.
- Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tsujimoto M, Arai H and Inoue K. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **274**:27776-27785.
- Bennett MR. (2002). Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart* **87**:480-487.
- Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, Clarke WP. (1998). Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* **54**:94-104.

- Bhattacharya M, Peri K, Ribeiro-da-Silva A, Almazan G, Shichi H, Hou X, Varma DR, Chemtob S. (1999). Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J Biol Chem* **274**:15719-15724.
- Bibb LC, Holt JK, Tarttelin EE, Hodges MD, Gregory-Evans K, Rutherford A, Lucas RJ, Sowden JC, Gregory-Evans CY. (2001). Temporal and spatial expression patterns of the CRX transcription factor and its downstream targets. Critical differences during human and mouse eye development. *Hum Mol Genet* **10**:1571-1579.
- Blaukat A, Barac A, Cross MJ, Offermanns S, Dikic I. (2000). G-Protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of G α q and G α l signals. *Mol Cell Biol* **20**:6837-6848.
- Booz GW, Conrad KM, Hess AL, Singer HA, Baker KM. (1992). Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology* **130**:3641-3649.
- Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR. (2002). The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* **277**:21453-7.
- Chao CP, Lauderkind SJ, and Ballou LR. (1994). Sphingosine mediated phosphatidyl metabolism and calcium mobilization. *J Biol Chem* **269**:5849-5856.
- Chen G, Way J, Armour S, Watson C, Queen K, Jayawickreme CK, Chen WJ, Kenakin T. (2000). Use of constitutive G-Protein coupled receptor activity for drug discovery. *Mol Pharmacol* **57**:125-134.
- Chen S, Lin F, Xu M, Graham RM. (2002). Phe(303) in TMVI of the alpha(1B)-adrenergic receptor is a key residue coupling TM helical movements to G-protein activation. *Biochemistry* **41**:588-596.
- Christopoulos A, Kenakin T. (2002). G-Protein-coupled receptor allostereism and complexing. *Pharmacol Rev* **54**:323-74.
- Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacol Rev* **54**:265-269.
- Chun J. (1999). Lysophospholipid receptors: implications for neural signaling. *Crit Rev Neurobiol* **13**:1151-1168.
- Cocco L, Rubbini S, Manzoli L, Billi AM, Faenza I, Peruzzi D, Matteucci A, Artico M, Gilmour RS, Rhee SG. (1999). Inositides in the nucleus: presence and characterisation of the isozymes of phospholipase beta family in NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Acta* **1438**:295-299.

- Conklin BR, Farfel Z, Lustig KD, Julius D, Bourne HR. (1993) Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature* **363**:274-276.
- Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. (2000a) Requirement for the IpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13384-13389.
- Contos JJA, Chun J. (2000b). Genomic characterization of the lysophosphatidic acid receptor gene, *lpA2/Edg4*, and identification of a frameshift mutation in a previously characterized cDNA. *Genomics* **64**:155–69.
- Contos JJA, Ishii I, Chun J. (2000c). Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* **58**:1188–1196.
- Coussin F, Scott RH, Wise A, Nixon GF. (2002). Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles: differential role in vasoconstriction. *Circ Res* **91**:151-157.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**:800-803.
- Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1998). Essential role for G-Protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**:685-688.
- Dautzenberg FM, Hauger RL. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* **23**:71-77.
- Devane WA. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**:1946-1949.
- Dumont C, Durrbach A, Bidere N, Rouleau M, Kreoemer G, Bernard G, Hirsch F, Charpentier B, Susin SA, Senik A. (2000). Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult. *Blood* **93**:1030-1038.
- Durieux ME, Carlisle SJ, Salafranca MN, Lynch KR. (1993). Responses to sphingosine 1-phosphate in *X. laevis* oocytes: similarities with lysophosphatidic acid signaling. *Am J Physiol* **264**:C1360-1364.
- Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. (1993). The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* **291**:677-80.

- El-Amraoui A, Sahly I, Picaud S, Sahel J, Abitbol M, Petit C. (1996). Human Usher 1B/mouse shaker-1: the retinal phenotype discrepancy explained by the presence/absence of myosin VIIA in the photoreceptor cells. *Hum Mol Genet* **5**:1171-1178.
- Erickson JR, Wu JJ, Goddard JG, Tigyi G, Kawanishi K, Tomei LD, Kiefer MC. (1998). Edg-2/Vzg-1 couples to the yeast pheromone response pathway selectively in response to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **273**:1506-1510.
- Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, Swaby R, Hasegawa Y, Tanyi JL, LaPushin R, Eder A, Jaffe R, Erickson J, Mills GB. (2002). Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta* **1582**:257-264.
- Flower DR. (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* **1422**:207-234.
- Fourcade O, Simon M F, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, und Chap H. (1995). Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* **80**:919–927.
- Fujita et al. (1983). *Bunseki Kagaku*, vol **32**, E379-386.
- Fukushima N, Ishii I, Contos JJA, Weiner JA, Chun J. (2001). Lysophospholipid receptors. *Ann Rev, Pharmacol Tox.* **41**:507-534.
- Gaits F, Fourcade O, Le Balle F, Gueguen G, Gaige B, Gassama-Diagne A, Fauvel J, Salles JP, Mauco G, Simon MF, Chap H. (1997). Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett* **410**:54-58.
- Glickman M, Malek RL, Kwitek-Black AE, Jacob HJ, und Lee NH. (1999). Molecular cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization of a novel nerve growth factor-regulated G-protein-coupled receptor, nrg-1. *Mol Cell Neurosci* **14**:141-152.
- Goetzl EJ, An S. (1998). Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J* **12**:1589-1598.
- Goetzl EJ, Lee H, Azuma T, Stossel TP, Turck CW, Karliner JS. (2000). Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **275**:14573-14578.
- Gohla A, Harhammer R, und Schultz G. (1998). The G-Protein G13 but not G12 mediates signalling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor to Rho. *J Biol Chem* **273**:4653-4659.

- Gonda K, Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Okazaki H, Sakrai T, Kimura S, Sillard R, Harii K, und Takuwa Y. (1999). The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways. *Biochem J* **337**:67-75.
- Gosh TK, Bian J, und Gill DL. (1994). Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored Calcium. *J Biol Chem* **269**: 22628-22635.
- Graler MH, Bernhardt G, 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.
- Greasley PJ, Fanelli F, Scheer A, Abuin L, Nenniger-Tosato M, DeBenedetti PG, Cotecchia S. (2001). Mutational and computational analysis of the alpha(1b)-adrenergic receptor. Involvement of basic and hydrophobic residues in receptor activation and G-Protein coupling. *J Biol Chem* **276**:46485-46494.
- Gueguen G, Gaige B, Grevy JM, Rogalle P, Bellan J, Wilson M, Kläebe A, Pont F, Simon MF, und Chap H. (1999). Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation. *Biochemistry* **38**:8440-8450.
- Guo Z, Liliom K, Fischer DJ, Bathurst IC, Tomei LD, Kiefer MC, Tigy. (1996) Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14367-72.
- Gutkind JS. (1998). The pathways connecting G-Protein-coupled receptors through divergent mitogen-activated Protein Kinase cascades. *J Biol Chem* **273**:1839-1842.
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. (1996). Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* **135**:1071-1083.
- Hildebrandt JD. (1997). Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G-Proteins. *Biochem Pharmacol* **54**:325-39.
- Himmel HM, Meyer Zu Heringdorf D, Graf E, Dobrev D, Kortner A, Schuler S, Jakobs KH, Ravens U. (2000). Evidence for Edg-3 receptor-mediated activation of I(K,ACh) by sphingosine-1-phosphate in human atrial cardiomyocytes. *Mol Pharmacol* **58**:449-54.
- Hisano N, Yatomi Y, Satoh K, Akimoto S, Mitsumata M, Fujino MA, und Ozaki Y. (1999). Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood* **93**:4293-4299.

- Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Liu CH, Thangada S, Thompson BD, Kluk M. (1999). Sphingosine-1-phosphate: extracellular mediator or intracellular second messenger? *Biochem Pharmacol* **58**:201-207.
- Hla T, Maciag T. (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **265**:9308-9313.
- Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, Milstien S, Spiegel S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* **291**:1800-1803.
- Horiuchi M, Lehtonen JY, Daviet L. (1999). Signaling Mechanism of the AT2 Angiotensin II Receptor: Crosstalk between AT1 and AT2 Receptors in Cell Growth. *Trends Endocrinol Metab* **10**:391-396.
- Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH, Patchett AA. (2001). Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci* **22**:132-140.
- Huang MC, Graeler M, Shankar G, Spencer J, Goetzl EJ. (2002). Lysophospholipid mediators of immunity and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* **1582**:161-167.
- Ignatova EG, Belcheva MM, Bohn LM, Neuman MC, Coscia CJ. (1999). Requirement of receptor internalisation for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence. *Neurosci* **19**:56-63.
- Im D-S, Clemens J, MacDonald TL, Lynch KR. (2001). Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): Structure-activity relationship of sphingosine 1-phosphate receptors. *Biochem* **40**:14053- 14060.
- Im D-S, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D, und Lynch KR. (2000a). Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol* **57**:753–59.
- Im D-S, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei G, Heavens RP, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G, George SR, Lynch K. (2000b). Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem* **275**:14281-14268.
- Im DS, Heise CE, Nguyen T, O'Dowd BF, Lynch KR. (2001). Identification of a molecular target of psychosine and its role in globoid cell formation. *J Cell Biol* **153**:429-434.

- Ishida T, Ishida M, Suero J, Takahash, M, Berk BC. (1999). Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. *J Clin Invest* **103**:789-797.
- Ishii I, Contos JJA, Fukushima N, Chun J. (2000). Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors. LP_{A1}/VZG-1/EDG-2, LP_{A2}/EDG-4, and LP_{A3}/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol* **58**:895–902.
- Jalink K, Hordijk PL, und Moolenaar WH. (1994). Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator *Biochim Biophys Acta* **1198**:185-196.
- Jalink K, Moolenaar WH, und van Dujin B. (1993). Lysophosphatidic acid is a chemoattractant for dictyostelium discoideum amoebae. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:1857-1861.
- Jensen AA, Spalding TA, Burstein ES, Sheppard PO, O'Hara PJ, Brann MR, Krogsgaard-Larsen P, Brauner-Osborne H. (2000). Functional importance of the Ala(116)-Pro(136) region in the calcium-sensing receptor. Constitutive activity and inverse agonism in a family C G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **275**,26547-29555.
- Kabarowski JH, Zhu K, Le LQ, Witte ON, Xu Y. (2001). Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A. *Science* **293**:702-705.
- Kannius-Janson M, Lidberg U, Bjursell G, Nilsson J. (2000). The tissue-specific regulation of the carboxyl ester lipase gene in exocrine pancreas differs significantly between mouse and human. *Biochem J* **351** Pt 2:367-376.
- Karliner JS. (2002). Lysophospholipids and the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta* **1582**:216-221.
- Kawanabe Y, Okamoto Y, Nozaki K, Hashimoto N; Miwa S, Masaki T. (2002). Molecular mechanism for endothelin-1-induced stress-fiber formation: analysis of G-Proteins using a mutant endothelin(A) receptor. *Mol Pharmacol* **61**:277-284.
- Kawasawa Y, Kume K, Izumi T, Shimizu T. (2000b). Mammalian PSP24s (alpha and beta isoforms) are not responsive to lysophosphatidic acid in mammalian expression systems. *Biochem Biophys Res Commun* **276**:957-964.
- Kawasawa Y, Kume K, Nakade S, Haga H, Izumi T, Shimizu T. (2000a). Brain-specific expression of novel G-protein-coupled receptors, with homologies to Xenopus PSP24 and human GPR45. *Biochem Biophys Res Commun* **276**:952-956.
- Kenakin T. (1995). Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* **16**:232-238.

- Kenakin TP. (1996). The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol Rev* **48**:413-463.
- Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanada T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. (2000). Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J* **348**:71-76.
- Kimura Y, Schmitt A, Fukushima N, Ishii I, Kimura H, Nebreda AR, Chun J. (2001). Two novel *Xenopus* homologs of mammalian LP(A1)/EDG-2 function as lysophosphatidic acid receptors in *Xenopus* oocytes and mammalian cells. *J Biol Chem* **276**:15208-15215.
- Kluk, MJ und Hla, T. (2001). Role of sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ res* **8**:496-502.
- Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S. (1998). Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* **273**:23722-23728.
- Kon J, Sato K, Watanabe T, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Tamama K, Ishizuka T, Murata N, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, und Okajima F. (1999). Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signalling pathways in their cDNA-transfected chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **274**:23940-23947.
- Kostenis E. (2001). Is G α 16 the optimal tool for fishing ligands of orphan G-Protein-coupled receptors? *TIPS* **22**:560-564.
- Kostenis E. (2002). Potentiation of GPCR-Signaling via membrane targeting of G-Protein α subunits. *J Recept Signal Transduct Res* **22**:269-283.
- Kotani M, Mollereau C, Detheux M, Le Poul E, Brezillon S, Vakili J, Mazarguil H, Vassart G, Zajac JM, Parmentier M. (2001). Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides *Br J Pharmacol* **133**:138-44.
- Kukkonen JP, Jansson CC, Akerman KE. (2001). Agonist trafficking of G(i/o)-mediated alpha(2A)-adrenoceptor responses in HEL 92.1.7 cells. *Br J Pharmacol* **132**:1477-84.
- Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. (2001). Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem* **276**:10627-10633.
- Le Poul E, Hisada S, Mizuguchi Y, Dupriez VJ, Burgeon E, Detheux M. (2002). Adaptation of aequorin functional assay to high throughput screening. *J Biomol Screen* **7**:57-65.

- Lee DK, George SR, Cheng R, Nguyen T, Liu Y, Brown M, Lynch KR, O'Dowd BF. (2001). Identification of four novel human G-Protein-coupled receptors expressed in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* **86**:13-22.
- Lee H, Goetzl EJ, An S. (2000). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**:C612-618.
- Lee OH, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, Kim KW, Kwon YG. (1999a). Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **264**:743-750.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. (1999b). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* **99**:301-312.
- Lee MJ, Thangada S, Liu CH, Thompson BD, and Hla T. (1998a). Lysophosphatidic acid stimulates the G-protein-coupled receptor edg-1 as a low affinity agonist. *J Biol Chem* **273**:22105-22112.
- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, and Hla T. (1998b). Sphingosine 1-phosphate as a ligand for the G-Protein coupled receptor EDG-1. *Science* **279**:1552-1555.
- Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T. (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* **14**:303-307.
- Leurs R, Smit MJ, Alewijnse AE, Timmerman H. (1998). Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem Sci* **23**:418-422.
- Levade T, Jaffrezou JP. (1999). Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta* **1438**:1-17.
- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW. (2001). Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity to the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci* **98**:7570-7575.
- Libert F, Schiffmann SN, Lefort A, Parmentier M, Gerard C, Dumont JE, Vanderhaeghen JJ, Vassart G. (1991). The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. *EMBO J* **10**:1677-1682.
- Lind GJ, Cavanagh HD. (1993). Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vi. Sci* **34**:2943-2952.

- Litosch I. (2002). Phosphatidic acid modulates G-Protein regulation of phospholipase C-beta1 activity in membranes. *Cell Signal* **14**:259-263.
- Liu B, Hannun YA. (1997). Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J Biol Chem* **272**:16281-16287.
- Liu CH, Hla T. (1997). The mouse gene for the inducible G-protein-coupled receptor edg-1. *Genomics* **43**:15-24.
- Liu H, Chakravarty D, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. (2002). Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **71**:493-511.
- Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL Jr, Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF, Caskey CT. (1999). Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* **266**:174-178.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**:1547-1550.
- Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG. (1999). Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol* **55**:1101-1107.
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115**:455-465.
- Lynch K und Im DS. (1999). Life on the edg. *Trends Pharmacol Sci* **20**:473-475.
- MacLennan AJ, Browe CS, Gaskin, AA, Lado D. und Shaw G. (1994). Cloning and characterization of a putative G-protein coupled receptor potentially involved in development *Mol Cell Neurosci* **5**:201-209.
- Maenhaut C, Van Sande J, Libert F, Abramowicz M, Parmentier M, Vanderhaegen JJ, Dumont JE, Vassart G, Schiffmann S. (1990). RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem Biophys Res Commun* **173**:1169-1178.
- Malek RL, Toman RE, Edsall LC, Wong S, Chiu J, Letterle CA, Van Brocklyn JR, Milstein S, Spiegel S, Lee NH. (2001). Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G-Protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *J Biol Chem* **23**:5692-5699.
- Malviya AN, Rogue PJ. (1998). "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* **92**:17-23.

- Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* **296**:346-9.
- Mandala SM, Thornton R, Galve-Roperh I, Poulton S, Peterson C, Olivera A, Bergstrom J, Kurtz MB, Spiegel S. (2000). Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:7859-64.
- Marchese A, Sawzdargo M, Nguyen T, Cheng R, Heng HH, Nowak T, Im DS, Lynch KR, George SR, O'dowd BF. (1999). Discovery of three novel orphan G-protein-coupled receptors. *Genomics* **56**:12-21.
- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**:97-106.
- Marinissen MJ, Gutkind JS. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**:368-376.
- Mazurais D, Robert P, Gout B, Berrebi-Bertrand I, Laville MP, Calmels T. (2002). Cell type-specific localization of human cardiac S1P receptors. *J Histochem Cytochem* **50**:661-70.
- McCune DF, Edelmann SE, Olges JR, Post GR, Waldrop BA, Waugh DJ, Perez DM, Piascik MT. (2000). Regulation of the cellular localization and signalling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol Pharmacol* **57**:659-666.
- McDonald PH, Lefkowitz RJ. (2001). Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal* **13**:683-689.
- Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Lipinski M, Alemany R, Rumenapp U, Jakobs KH. (2001). Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *Eur J Pharmacol* **414**:145-154.
- Meyer zu Heringdorf D., van Koppen CJ, und Jakobs KH. (1997). Molecular diversity of sphingolipid signalling. *FEBS Lett* **410**:34-38.
- Meyer zu Heringdorf D, van Koppen CJ, Windorfer B, Himmel HM, und Jakobs KH. (1997). Calcium signalling by G-Protein coupled sphingolipid receptors in bovine aortic endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **354**:397-403.
- Milligan G, Bond RA, Lee M. (1995). Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci* **16**:10-13.

- Mills GB, Eder A, Fang X, Hasegawa Y, Mao M, Lu Y, Tanyi J, Tabassam FH, Wiener J, Lapushin R, Yu S, Parrott JA, Compton T, Tribley W, Fishman D, Stack MS, Gaudette D, Jaffe R, Furui T, Aoki J, Erickson JR. (2002). Critical role of lysophospholipids in the pathophysiology, diagnosis, and management of ovarian cancer. *Cancer Treat Res* **107**:259-283.
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* **140**:627-636.
- Miserey-Lenkei S, Parnot C, Bardin S, Corvol P, Clauser E. (2002). Constitutive internalisation of constitutively active angiotensin II AT(1A) receptor mutants is blocked by inverse agonists. *J Biol Chem* **277**:5891-5901.
- Moolenaar WH, Kranenburg O, Postma FR, and Zondag GCM. (1997). Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol* **9**:168-173.
- Morris AJ. (1999). One wheel on my wagon: lysolipid phosphate signalling. *Trends Pharmacol Sci* **20**:393-395.
- Motohashi K, Shibata S, Ozaki Y, Yatomi Y, Igarashi Y. (2000). Identification of lysophospholipid receptors in human platelets: the relation of two agonists, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FEBS Lett* **468**:189-913.
- Nakajima N, Cavalli AL, Biral D, Glembotski CC, McDonough PM, Ho PD, Betto R, Sandona D, Palade PT, Dettbarn CA, Klepper RE, Sabbadini RA. (2000). Expression and characterization of Edg-1 receptors in rat cardiomyocytes: calcium deregulation in response to sphingosine 1-phosphate. *Eur J Biochem* **267**:5679-56786.
- Nava VE, Lacana E, Poulton S, Liu H, Sugiura M, Kono K, Milstien S, Kohama T, Spiegel S. (2000). Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett* **473**:81-84.
- Neuss M, Crow M T, Chesley A, Lakatta EG. (2001). Apoptosis in cardiac disease - what is it - how does it occur. *Cardiovasc Drugs Ther* **15**:507-523.
- Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF. (2001). Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* **59**:427-433.
- Nicholson DW und Thornberry NA. (1997). Caspases: killer proteases. *TIBS* **22**:299-306.
- Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* **275**:36781-36786.

- Okamoto H, Takuwa N, Gonda K, Okazaki H, Chang K, Yatomi Y, Shigematsu H, and Takuwa Y. (1998). EDG1 is a functional sphingosine 1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signalling pathways, including phospholipase C activation, Ca²⁺-mobilization, ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *J Biol Chem* **273**:27104-27110.
- Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Gonda K, Shigematsu H, and Takuwa Y. (1999). EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG1 and AGR16. *Biochem Biophys Res Commun* **260**:203-208.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkam RE, Yamamoto M, and Miyano M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G-Protein-coupled receptor *Science* **289**:739-745.
- Panetti TS, Magnusson MK, Peyruchaud O, Zhang Q, Cooke ME, Sakai T, Mosher DF. (2001). Modulation of cell interactions with extracellular matrix by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate *Prostaglandins* **64**:93-106.
- Panetti TS. (2002). Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1582**:190-196.
- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, Vassart G. (1993). Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* **365**: 649-651.
- Parnot C, Bardin S, Miserey-Lenkei S, Guedin D, Corvol P, Clauser E. (2000). Systematic identification of mutations that constitutively activate the angiotensin II type 1A receptor by screening a randomly mutated cDNA Library with an original pharmacological bioassay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:7615-7620.
- Parrill AL, Wang D, Bautista DL, Van Brocklyn JR, Lorincz Z, Fischer DJ, Baker DL, Liliom K, Spiegel S, Tigyi G. (2000). Identification of Edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* **275**:39379-39384.
- Pauwels PJ & Wurch T. (1998). Review: amino acid domains involved in constitutive activation of G-protein-coupled receptors. *Mol Neurobiol* **17**:109-135.
- Pei G, Samama P, Lohse M, Wang M, Codina J, Lefkowitz RJ. (1994). A constitutively active mutant beta 2-adrenergic receptor is constitutively desensitized and phosphorylated. *Proc Nat Acad Sci* **91**:2699-2702.
- Perez DM, Hwa J, Gaivin R, Mathur M, Brown F, Graham RM. (1996). Constitutive activation of a single effector pathway: evidence for multiple activation states of a G-Protein-coupled receptor. *Mol Pharmacol* **49**:112-122.

- Poot M, Hudson FN, Grossmann A, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ. (1996). Probenicid inhibition of fluorescence extrusion after MCB-staining of rat-1 fibroblasts. *Cytometry* **23**:78-81.
- Postma R, Jalink K, Hengeveld T, Moolenaar WH. (1996). Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor. *EMBO J* **15**:2388-2392.
- Pyne S, Pyne N. (2000b). Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* **349**:385-402.
- Pyne S, Pyne N. (2000a). Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **88**:115-131
- Raben DM, Baldassare JJ. (2000). Nuclear envelope signalling-role of phospholipid metabolism. *Eur J Histochem* **44**, 67-80. Review
- Rakhit S, Conway AM, Tate R, Bower T, Pyne NJ, Pyne S. (1999). Sphingosine 1-phosphate stimulation of the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in airway smooth muscle. Role of endothelial differentiation gene 1, c-Src tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* **338**:643-91
- Ramsay D, Bevan N, Rees S, Milligan G. (2001). Detection of receptor ligands by monitoring selective stabilization of a Renilla luciferase-tagged, constitutively active mutant, G-protein-coupled receptor. *Br J Pharmacol* **133**:315-323.
- Rao VR, Cohen GB, Oprian DD. (1994). Rhodopsin mutation G90D and a molecular mechanism for congenital night blindness. *Nature* **367**:639-642.
- Rizza C, Leitinger N, Yue J, Fischr DJ, Wang D, Shih PT, Lee H, Tigyi G, and Berliner JA. (1999). Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Laboratory Investigation* **79**:1227-1235.
- Rizzo MA, Romero G. (2002). Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade *Pharmacol Ther* **94**: 35-50.
- Robert P, Tsui P, Laville MP, Livi GP, Sarau HM, Bril A, Berrebi-Bertrand I. (2001). EDG1 receptor stimulation leads to cardiac hypertrophy in rat neonatal myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **33**:1589-1606.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function *Nature* **415**:206-212.
- Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* **414**:209-212.

- Ruat M, Molliver ME, Snowman AM, Snyder SH. Ruat M, Molliver ME, Snowman AM, Snyder SH. (1995). Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:3161-3165.
- Sadahira Y, Ruan F, Hakomori S, und Igarashi Y. (1992). Sphingosine 1-phosphate, a specific endogeneous signalling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9686-9690.
- Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Heller Brown J. (2000). The role of rho in G-Protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:459-489.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, und Lefkowitz RJ. (1993). A mutation induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* **268**:4625-4636.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467.
- Scheer A & Cotecchia S. (1997). Constitutively active G-Protein-coupled receptors: potential mechanisms of receptor activation. *J Recept Signal Transduct* **17**:57-7.
- Scheer A, Costa T, Fanelli F, De Benedetti PG, Mhaouty-Kodja S, Abuin L, Nenniger-Tosato M, Cotecchia S. (2000). Mutational analysis of the highly conserved arginine within the Glu/Asp-Arg-Tyr motif of the alpha(1b)-adrenergic receptor: effects on receptor isomerization and activation. *Mol Pharmacol* **57**:219-231.
- Schiffmann S. (1990). RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem Biophys Res Commun* **173**:1169-1178.
- Schöneberg T, Sandig V, Wess J, Gudermann T, und Schultz G. (1997). Reconstitution of mutant V2 vasopressin receptors by adenovirus-mediated gene transfer. Molecular basis and clinical implication. *J Clin Invest* **100**:1547-1556.
- Schulze C, Smales C, Rubin LL, und Staddon JM. (1997). Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *J Neurochem* **68**:991-1000.
- Selbie LA, Hill SJ. (1998). G-Protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci* **19**:87-93.
- Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJr, Minegishi T, Cutler GB Jr. (1993). A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* **365**:652-654.

- Shetzline MA, Walker JK, Valenzano KJ, Premont RT. (2002). Vasoactive Intestinal Polypeptide Type-1 Receptor Regulation. DESENSITIZATION, PHOSPHORYLATION, AND SEQUESTRATION *J Biol Chem* **277**:25519-25526.
- Shichida Y, Imai H. (1998). Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals. *Cell Mol Life Sci* **54**:1299-1315.
- Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, und Aepfelbacher M. (1999). Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6931-6936.
- Sinnott-Smith J, Lunn JA, Leopoldt D, Rozengurt E. (2001). Y-27632, an inhibitor of Rho-associated kinases, prevents tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin induced by bombesin: dissociation from tyrosine phosphorylation of p130(CAS). *Exp Cell Res.*, **266**:292-302.
- Songzhu An, M. Avery Dickens, Thieu Bleu, Olivia G. Hallmark, Edward J. Goetzl (1997). Molecular Cloning of the Human Edg2 Protein and Its Identification as a Functional Cellular Receptor for Lysophosphatidic Acid *Biochem Biophys Res Commun* **231**:619-622.
- Spiegel S, und Merrill AH, Jr. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J* **10**:1388–1397.
- Spiegel S, und Milstein S. (1995). Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers. *Membrane Biol* **146**:225–233.
- Spiegel S, Milstien S. (2000). Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett* **476**:55-57.
- Stam JC, Michiels F, van der Kammen RA, Moolenaar WH, Collard JG. (1998). Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *EMBO J* **17**:4066-4074.
- Stevens PA, Bevan N, Rees S, Milligan G. (2000). Resolution of inverse agonist-induced up-regulation from constitutive activity of mutants of the alpha(1b)-adrenoceptor. *Mol Pharmacol* **58**:438-448.
- Stoffel W. (1970). Studies on the biosynthesis and degradation of sphingosine bases. *Chem Phys Lipids* **5**:139-158.
- Sugiyama A, Aye NN, Yatomi Y, Ozaki Y, Hashimoto K. (2000). Effects of sphingosine 1-phosphate, a naturally occurring biologically active lysophospholipid, on the rat cardiovascular system. *Jpn J Pharmacol* **82**:338-42.

- Takahashi M, Mukai H, Toshimori M, Miyamoto M, Ono Y. (1998). Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis. *Proc Nat Acad Sci* **95**:11566-11571.
- Tamama KI, Kon J, Sato K, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Kanda T, Ohta H, Ui M, Kobayashi I und Okajima F. (2001). Extracellular mechanism through the Edg family of receptors might be responsible for sphingosine 1-phosphate-induced regulation of DNA synthesis and migration of rat aortic smooth-muscle cells. *Biochem J* **353**:139-46.
- Tan T, Chu G. (2002). p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol* **22**:3247-3254.
- The Laboratory rat, von George J. Krinke. (1999). *Academic Press*
- Tigyi G. (2001). Physiological responses to lysophosphatidic acid and related glycerophospholipids. *Prostaglandins* **64**:47-62.
- Tokumura A, Fukuzawa K, Akamatsu Y, Yamada S, Suzuki T, Tsukatani H. (1978). Identification of vasopressor phospholipid in crude soybean lecithin. *Lipids* **13**:468-472.
- Tokumura A, Fukuzawa K, Yamada S, und Tsukatani H. (1980). Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregnant rats. *Arch. Int. Pharmacodyn Ther* **245**:74-83.
- Tokumura A, Yotsumoto T, Masuda Y, und Tanaka S. (1995). Vasopressor effect of lysophosphatidic acid on spontaneously hypertensive rats and wistar kyoto rats. *Res Comm Mol Patol Pharmacol* **90**: 96-102.
- Touhara K, Sengoku S, Inaki K, Tsuboi A, Hirono J, Sato T, Sakano H, Haga T. (1999). Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci* **96**:4040-4045.
- Van Brocklyn JR, Tu Z, Edsall LC, Schmidt RR, Spiegel S. (1998). Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction are mediated by the G-Protein-coupled receptor H218. *J Biol Chem* **274**:4626-32.
- van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. (1989). Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G-Proteins. *Cell* **59**:45-54.
- Van Koppen C, Meyer zu Heringdorf D, Laser KT, Zhang C, Jakobs KH, Bunemann M, und Pott L. (1996). Activation of a high affinity Gi protein-coupled plasma membrane receptor by sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* **271**:2082-2087.
- Van Sande J, Parma J, Tonacchera M, Swillens S, Dumont J, Vassart G. (1995). In Chinese hamster ovary K1 cells dog and human thyrotropin receptors activate both the cyclic AMP and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate cascades in the presence of thyrotropin and cyclic AMP cascade in its absence. *Eur J Biochem* **229**, 338-343.

- Vilardaga JP, Krasel C, Chauvin S, Bambino T, Lohse MJ, Nissenson RA. (2002). Internalization determinants of the parathyroid hormone receptor differentially regulate beta-arrestin/receptor association. *J Biol Chem* **277**:8121-8129.
- Vogelstein B und Gillespie D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci* **76**:615-619.
- Vogt W. (1949). Über die stoffliche Grundlage der Darmbewegungen und des Vagusreizes. *Arch Exp Path Pharmacol* **206**:1.
- Wang DA, Lorincz Z, Bautista DL, Liliom K, Tigyi G, Parrill AL. (2001). A single amino acid determines lysophospholipid specificity of the S1P1 (EDG1) and LPA1 (EDG2) phospholipid growth factor receptors. *J Biol Chem* **276**:49213-49220.
- Wang F, Van Brocklyn JR, Edsall L, Nava VE, Spiegel S. (1999b). Sphingosine-1-phosphate inhibits motility of human breast cancer cells independently of cell surface receptors. *Cancer Res* **59**:6185-6191.
- Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S. (1999a). Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem*. **274**:35343-35350.
- Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW und Kenakin TP. (1996). The cubic ternary complex receptor. Occupancy model. III. Resurrecting efficacy. *J Theor Biol* **181**:381-397.
- Welsby PJ, Kellett E, Wilkinson G, Milligan G. (2002). Enhanced detection of receptor constitutive activity in the presence of regulators of G-Protein signaling: applications to the detection and analysis of inverse agonists and low-efficacy partial agonists. *Mol Pharmacol* **61**:1211-1221.
- Wieland T und Jakobs KH. (1994). Measurement of receptor-stimulated guanosine 5'-O-(γ -thio)triphosphate binding by G-Proteins. *Methods Enzymol* **237**:1-13.
- Wilson S, Bergsma DJ, Chambers JK, Muir AI, Fantom KG, Ellis C, Murdock PR, Herrity NC, Stadel JM. (1999). Orphan G-protein-coupled receptors: the next generation of drug targets? *Br J Pharmacol* **125**:1387-1392.
- Windh RT, Lee MJ, Hla T, An S, Barr AJ, Manning DR. (1999). Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G-Proteins. *J Biol Chem* **274**:27351-8.
- Xing, H., Tran, H.C., Kanpp, T.E., Negulescu, P.A., Pollok, B.A. (2000). A fluorescent reporter assay for the detection of ligands acting through Gi protein-coupled receptors. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **4**:189-210.

- Xu Y, Zhu K, Hong G, Wu W, Baudhuin LM, Xiao Y, Damron DS. (2000). Sphingosylphosphorylcholine is a ligand for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1. *Nat Cell Biol* **2**:261-267.
- Yamaguchi F, Tokuda M, Hatase O, Brenner S. (1996). Molecular cloning of the novel human G-Protein-coupled receptor (GPCR) gene mapped on chromosome 9. *Biochem Biophys Res Commun* **227**:608-614.
- Yamazaki Y, Kon J, Sato K, Tomura H, Yoneya T, Okazaki H, Okajima F, & Ohta H. (2000). Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **268**:583-589.
- Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, Asazuma N, Satoh K, Ozaki Y, Kume S. (1997a). Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem (Tokyo)* **121**:969-973.
- Yatomi Y, Yamamura S, Ruan F, und Igarashi Y. (1997b). Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **272**:5291-5297.
- Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S, Igarashi Y. (1995). Sphingosine 1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* **86**:193-202.
- Zhang G, Contos JJA, Weiner JA, Fukushima N, Chun J. (1999). Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene* **227**:89–99.
- Zhang H, Buckley NE, Gibson K, Spiegel S. (1990). Sphingosine stimulates cellular proliferation via a protein kinase C-independent pathway. *J Biol Chem* **265**:76-81.
- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, und Spiegel S. (1991). Sphingosine 1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* **114**:155-167.
- Zhu K, Baudhuin LM, Hong G, Williams FS, Cristina, KL, Kabarowski JH, Witte ON, Xu Y. (2001). Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G-Protein-coupled receptor GPR4. *J Biol Chem* **276**:41325-41335.
- Ziyal R, Ziganshin AU, Nickel P, Ardanuy U, Mutschler E, Lambrecht G, Burnstock G. (1997). Vasoconstrictor responses via P2X-receptors are selectively antagonized by NF023 in rabbit isolated aorta and saphenous artery. *Br J Pharmacol* **120**:954-960
- Zondag GC, Postma FR, Etten IV, Verlaan I, Moolenaar WH. (1998). Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem J* **330**:605–609.

8 Veröffentlichungen und Patente

Originalveröffentlichungen

Bodo Cremers, Markus Flesch, Evi Kostenis, Christoph Maack, **Anke Niedernberg**, Alexander Stoff, Michael Südkamp, Olaf Wendler and Michael Böhm (2002). Modulation of myocardial contractility by lysophosphatidic acid (LPA) *J Mol Cell Cardiol.* *Im Druck*

Anke Niedernberg, Constanze R. Scherer, Andreas E. Busch und Evi Kostenis (2002). Comparative analysis of human and rat S1P₅ (edg8): Different expression profiles and differential sensitivity to antagonists. *Biochem Pharmacol* **64**:1243-50.

Anke Niedernberg, Andree Blaukat, Torsten Schöneberg und Evi Kostenis (2002). Regulated and constitutive activation of specific signalling pathways by the human S1P₅ receptor. *Br. J. Pharmacol.* *Im Druck*

Anke Niedernberg, Sorin Tunaru, Andree Blaukat, Ali Ardati und Evi Kostenis (2002). Sphingosine 1-phosphate and dioleoylphosphatidic acid are low affinity agonists for the orphan receptor GPR63. *Cell Signal.* *Im Druck*

Anke Niedernberg, Sorin Tunaru, Andree Blaukat, Bruce Harris, Ursula Stillger, und Evi Kostenis (2002). Comparative analysis of functional assays for characterization of agonist ligands at G-Protein coupled receptors. *J Biomol Screen.* *Eingereicht*

Patente

Der humane S1P₅-Rezeptor (hedg8) mit den im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnissen wurde unter der Patentnummer: **DEAV200/A024** zum Patent eingereicht.

Der humane GPR63 (h45like) mit den im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnissen wurde unter der Patentnummer: **DEAV2002/0033** zum Patent eingereicht.

9 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde als externe Doktorarbeit in der Abteilung Cardiovascular Diseases der Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Prof. Dr. Andreas E. Busch und Dr. Evi Kostenis angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt:

- Dr. Evi Kostenis für die freundliche Unterstützung und kompetente fachliche Betreuung der Doktorarbeit sowie für Ihre Geduld und die Unterstützung beim Verfassen der Publikationen.
- Prof. Dr. Andreas E. Busch für das Bereitstellen des Themas und die Betreuung der Arbeit sowie seine zuverlässige Unterstützung.
- Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler von der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main für die freundliche Betreuung und die Begutachtung meiner Arbeit, durch die diese Dissertation erst ermöglicht wurde.
- Dr. Bruce Harris, Shannon Dwyer, Dr. Doug McDonald, Margaret McKenney und Jack Kohler von der Abteilung ZNS bei Aventis Pharmaceuticals, Bridgewater, für die intensive Betreuung und Unterstützung während meines USA-Aufenthaltes. Dr. Ali Ardati, Aventis Pharmaceuticals, Bridgewater, für die Durchführung der Echt-Zeit-PCR.
- PD Dr. Torsten Schöneberg (FU Berlin), Dr. Andree Blaukat und Sorin Tunaru (Universität Heidelberg) für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und die interessanten Anregungen.
- Dr. Johann Gassenhuber und Dr. Marc Broenstrup für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit.
- Ursula Stillger und Bernd Eidenmüller für die nette Atmosphäre und praktische Unterstützung im Labor.
- Kirsten Uhlenbrock und Almut Hattenberger für die gemeinsamen Arbeitsstunden im Labor.
- Dr. Petra Arndt, Dr. Constanze Scherer, Karen Menning, Dr. Jochen Huber für die hilfreiche Unterstützung in allen Lebenslagen sowie für interessante Diskussionen und Gespräche.
- Meinen Eltern, Christian Uhl, meinem Bruder und Dr. Ingo Guhde für die ausgleichenden Stunden außerhalb des Labors.
- Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

10 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Anke Niedernberg
Wohnort: Frankfurt am Main
Geburtstag: 23. 03. 1974
Geburtsort: Frankfurt am Main

Ausbildung

1979-1983 Grundschohle in Bad Soden/Ts
1983-1992 St. Angela Schule, Königstein
Abitur 1993
1993-1998 Studium der Pharmazie an der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg, 2. Staatsexamen (1997, Akadem. Lehrer: Prof. Dr. M. J. Lohse, Prof. Dr. I. Zimmermann, Prof. Dr. P. Procksch, Prof. Dr. S. Ebel, Prof. Dr. Czygan), 3. Staatsexamen und Approbation zur Apothekerin im Dezember 1998
seit 05/1999 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Abteilung Cardiovascular Diseases der Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. E. Busch und Herrn Prof. Dr. Dr. med. E. Mutschler

Praktika

03/1994 Famulatur in der Thermen Apotheke, Bad Soden
08/1994 Famulatur in der Römer Apotheke, Rottenburg
11/1997 - 04/1998 Pharmaziepraktikum bei Beiersdorf-Lilly, Hamburg
05/1998 – 10/1998 Pharmaziepraktikum in der Osterapotheke, Hamburg

Auslandsaufenthalte

09/1990 – 12/1990: Schulbesuch am Lycée International in St. Germain-en Laye, Frankreich
02/2002 – 03/2002 im Rahmen der Promotion Aufenthalt in der Abteilung ZNS, Aventis Pharmaceuticals, Bridgewater, USA