

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Prof. Dr. med. Udo Schumacher

## **Expression von LPA-Rezeptoren in humanen metastasierenden und nicht-metastasierenden Tumorzellen in immundefizienten Mäusen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Christoph Alexander Berliner  
aus Engelskirchen

Hamburg 2012

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.09.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof Dr. Udo Schumacher**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Klaus Pantel**

**Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. Felicitas Pröls**

# Inhaltsverzeichnis

1	ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG .....	6
2	EINLEITUNG.....	7
2.1	SYNTHESE .....	9
2.2	LPA-REZEPTOREN.....	10
2.3	FUNKTION UND PATHOPHYSIOLOGIE.....	11
3	MATERIAL UND METHODEN .....	16
3.1	MATERIAL UND PROBENGEWINNUNG .....	16
3.1.1	Humane Zelllinien .....	16
3.1.2	HUVEC.....	18
3.1.3	Zellkultur .....	18
3.1.4	Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Mausgewebe .....	18
3.1.5	Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Tumore .....	18
3.1.6	RNA-Isolation .....	19
3.1.6.1	RNA-Isolation aus Zelllinien.....	19
3.1.6.2	RNA-Isolation aus Tumoren.....	19
3.1.6.3	Konzentrationsbestimmung .....	20
3.1.7	cDNA Synthese.....	20
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	22
3.2.1	Schmelzkurvenanalyse.....	22
3.2.2	PCR: Ansatz und Protokolle.....	23
3.2.2.1	Primer.....	23
3.2.2.1.1	PCR-Produkte .....	24
3.2.2.1.2	Thermo-PCR .....	25
3.2.2.1.3	RTQ-PCR .....	27

4	ERGEBNISSE .....	29
4.1	RNA-EXTRAKTION.....	29
4.1.1	Zelllinien .....	29
4.1.2	Tumore.....	30
4.1.3	Murine Zellen.....	30
4.2	CDNA SYNTHESE.....	31
4.3	PRIMEROPTIMIERUNG .....	31
4.3.1	Effizienzen und Fehler aller Primerpaare nach Standardkurvenerstellung.....	32
4.3.2	Primerspezifität .....	32
4.4	AKTIN .....	33
4.4.1	beta-Aktin Expression in Zelllinien.....	33
4.4.2	beta-Aktin Expression in Xenografttumoren .....	34
4.5	EXPRESSION DER LYSOPHOSPHATIDREZEPTOREN .....	35
4.6	HUVEC .....	35
4.7	LPA1 .....	36
4.7.1	Zelllinien .....	37
4.7.2	Xenografttumore .....	37
4.8	LPA2 .....	38
4.8.1	Zelllinien .....	38
4.8.2	Xenografttumore .....	39
4.9	LPA3 .....	41
4.9.1	Zelllinien .....	41
4.9.2	Xenografttumore .....	41
5	DISKUSSION.....	43
5.1	KOLONKARZINOMZELLINIEN .....	44

5.2	MAMMAKARZINOMZELLINIEN.....	44
5.3	MELANOMZELLINIEN .....	45
5.4	ZELLINIEN DES KLEINZELLIGEN BRONCHIALKARZINOMS .....	45
5.5	REFERENZGEN BETA-AKTIN .....	45
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	47
7	ANHANG.....	48
7.1	LITERATURVERZEICHNIS .....	48
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	58
7.3	DANKSAGUNG .....	60
7.4	LEBENS LAUF.....	61
7.5	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....	64

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

In einigen wenigen Arbeiten ist eine mögliche Rolle der Lysophosphatid (LPA)-Rezeptoren, insbesondere bei der Metastasierung von Ovarialkarzinomen und bei der Metastasierung in den Knochen untersucht worden (Boucharaba et al., 2004, Boucharaba et al., 2006, Fang et al., 2000). Da bisher noch keine Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Metastasierung und LPA-Rezeptorexpression an klinisch relevanten Tiermodellen vorliegen, sollten an diesen Modellen folgende Fragen untersucht werden: Lässt sich die LPA-Rezeptorenexpression von humanen Tumoren, die auf immundefizienten Mäusen gewachsen waren, mit dem Metastasierungsverhalten der Tumorzellen in diesen Modellen korrelieren? Ist bei der Untersuchung der Funktion der LPA-Rezeptoren die Zellkultur der Untersuchung im Tierversuch gleichwertig? Methodisch sollen dreizehn verschiedene humane Tumorzelllinien und die von diesen Tumoren ausgehenden Primärtumore auf ihre relative Expression der drei LPA Rezeptoren eins bis drei untersucht werden. Als Vergleich soll dabei die Nichttumorzelllinie HUVEC dienen. Durch den direkten Vergleich von Zellen aus Zellkultur und aus in Mäusen herangezüchteten Primärtumoren soll auch eine Aussage zur Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit von Projekten in Zellkultur und im Tierversuch getroffen werden.

## 2 Einleitung

Lysophosphatidsäure (LPA) (Abb. 1) ist ein einfaches bioaktives Phospholipidderivat, welches eine wichtige Rolle bei der extrazellulären und vermutlich sogar intrazellulären Signalübermittlung spielt. Das Molekül besteht aus einer einzelnen Fettsäure, die mit einer freien Phosphatgruppe an Glycerin gekoppelt ist. Aufgrund seiner geringen Größe und dem amphiphilen Charakter ist LPA sehr gut wasserlöslich. Zusätzlich zu seiner Rolle als Grundbaustein in Membranphospholipiden übernimmt LPA eine Rolle als

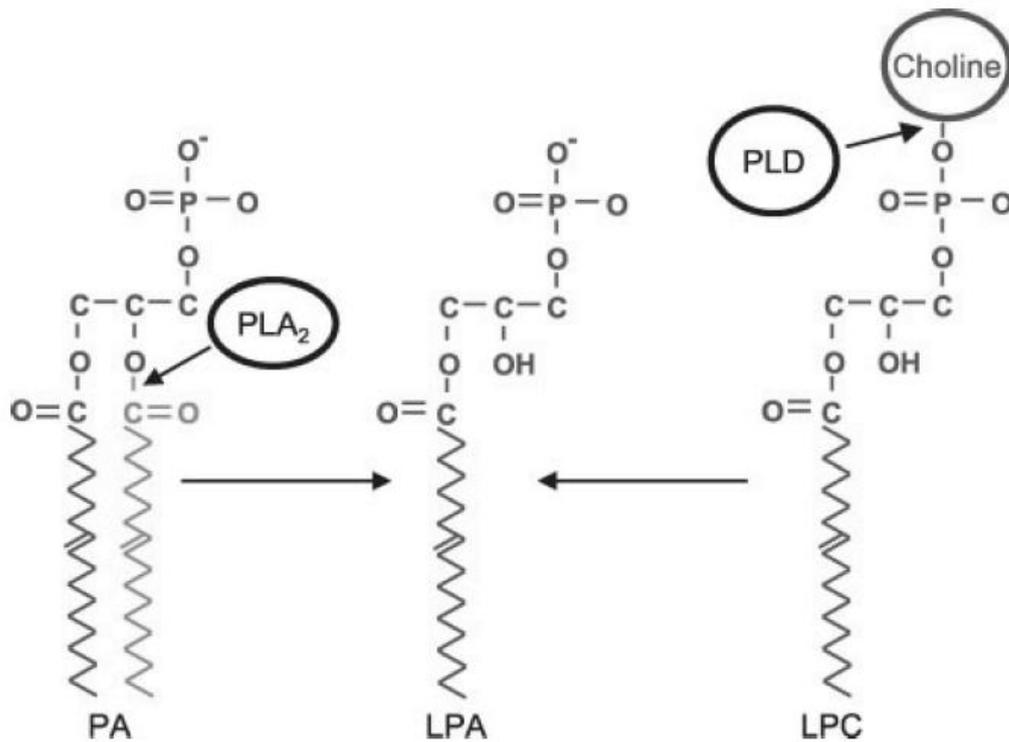


Abbildung 1: LPA und seine Herstellung mit Hilfe von Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) und Phospholipase D (PLD). Weitere Information im Text. Zeichnung nach (Moolenaar et al., 2004).

intrazellulärer Botenstoff. Mit der Entdeckung der mitogenen Wirkung von LPA auf Fibroblasten und des Wirkmechanismus über spezielle G-Protein gekoppelte Rezeptoren (van Corven et al., 1989, van der Bend et al., 1992, Moolenaar, 1995), begann um 1990 die intensive Erforschung von LPA. Es folgte die Entdeckung verschiedener LPA-Rezeptoren (Hecht et al., 1996, Contos et al., 2000) und die Aufdeckung des Syntheseweges für dieses Molekül. Heutzutage geht man davon aus, dass für Säugetiere mindestens drei unterschiedliche LPA-Rezeptoren existieren. Anfänglich wurde es nur als Wachstumsfaktor klassifiziert, später wurde die Liste der möglichen zellulären Antworten auf LPA kontinuierlich erweitert und umfasst heute Effekte wie Ca<sup>2+</sup>-Homöostase, zytoskelettale Reorganisation, Zellproliferation und

Zellüberleben, Migration und Adhäsion, Neuritenretraktion und Gap-junction Verschluss (Meyer zu Heringdorf and Jakobs, 2007). Zusätzlich zu der breiten physiologischen Aktivität von LPA konnte auch eine Rolle in pathophysiologischen Prozessen gezeigt werden. Darunter fallen autoimmune Prozesse (Choi et al., 2010), Immundefizienzerkrankungen, Arteriosklerose und Krebserkrankungen. Speziell wurden LPA-Rezeptorsignalwege mit der Entwicklung und Progression von malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Mills and Moolenaar, 2003, Ishii et al., 2004). Diese große Aktivitätsbandbreite von LPA scheint zunächst erstaunlich, korreliert aber mit der großen Diversität von bisher identifizierten G-Protein gekoppelten Signalwegen (Moolenaar, 1999). Außerdem wirkt LPA nicht nur über die klassischen „second messenger“ Wege, sondern koppelt auch an die kleinen G-Proteine der Ras und Rho Familie. Gut charakterisiert ist seine Biosynthese aus Phosphatidylcholin. Hierbei wird das Cholin durch die Phospholipase D abgespalten und es entsteht das bioaktive Molekül LPA. Allgemein tritt Lysophosphatidsäure als Zwischenprodukt in der de novo Synthese von Membranphospholipiden auf. Dadurch enthalten alle Zellen kleine Mengen an LPA. Für die Signalübermittlung entscheidend sind jedoch die Zellen, die signifikante Mengen von extrazellulärem LPA produzieren können. Hierzu zählen aktivierte Thrombozyten, welche wahrscheinlich für das Auftreten von signifikanten Mengen von LPA im Serum verantwortlich sind (Eichholtz et al., 1993a). Im Gegensatz zu Plasma ist Serum eine reichhaltige Quelle für bioaktives LPA. Ebenso konnte es in anderen Körperflüssigkeiten, wie Speichel, Follikularflüssigkeit und Absonderungen aus malignen Prozessen nachgewiesen werden. Im Serum bindet LPA an Albumin, Gelsolin und weitere, bisher nicht identifizierte Proteine (Tigyi and Miledi, 1992, van der Bend et al., 1992, Eichholtz et al., 1993b, Jalink et al., 1994, Goetzl et al., 2000). Obwohl eine frühe Arbeit zeigen konnte, dass LPA von aktivierten Plättchen freigesetzt wird (Eichholtz et al., 1993b), war es lange Zeit unklar, wie größere Mengen des Phospholipides unter physiologischen Umständen synthetisiert werden. Lange Zeit wurde daher angenommen, dass größere Mengen von LPA intrazellulär gespeichert werden und durch Aktivierung von Zellen freigesetzt werden. Die Phospholipasen A2 und D gelten als die wahrscheinlichsten produzierenden Enzyme, da sie sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommen. Inzwischen wurde aber für das lösliche Ektoenzym Autotaxin (ATX) gezeigt, dass es die entscheidende Rolle in der LPA-Produktion spielt. Für ATX, welches auch als die Pyrophosphatase/Phosphodiesterase NPP2 bekannt ist, konnte gezeigt werden, dass es identisch mit Lysophospholipase D (lysoPLD) ist (Tokumura et al., 2002, Umezu-Goto et al., 2002). Für ATX wurde vorher schon eine Funktion in Tumorinvasion, Angiogenese und Metastasierung nachgewiesen (Moolenaar et al., 2004, van Meeteren and Moolenaar, 2007, Moolenaar, 1999).

**Tabelle 1: Fakten zu LPA**

<ul style="list-style-type: none"><li>• Wasserlöslich</li><li>• Biologisch aktiv bei Konzentrationen von <math>10^{-9}</math> – <math>10^{-6}</math> M</li><li>• Nachgewiesene physiologisch relevante Konzentrationen in:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Serum (nach erfolgter Plättchenaktivierung)</li><li>○ Speichel</li><li>○ Follikularflüssigkeit</li><li>○ Samenflüssigkeit</li><li>○ Leicht oxidiertes LDL</li><li>○ Maligne Punktate</li></ul></li><li>• Bekannte LPA-Bindungsproteine im Serum:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Albumin</li><li>○ Gelsolin</li><li>○ 15 und 28 kDa Proteine (noch nicht identifiziert)(van der Bend et al., 1992)</li></ul></li><li>• Produktion durch:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Aus LPC durch lysoPLD/Autotaxin/NPP2</li><li>○ Sekretorische Typ II PLA<sub>2</sub></li><li>○ Phosphatidsäureselektive PLA<sub>1</sub></li></ul></li><li>• Abbau/Degradation durch:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Membranständige Lipidektophosphatasen (aus der LPP-Familie)</li></ul></li></ul>
Tabelle frei nach (Moolenaar et al., 2004)

## 2.1 Synthese

Die lange offenstehende Frage, wie LPA gebildet, und wie seine Konzentration kontrolliert wird, scheint zumindest teilweise gelöst zu sein. Bei der bekannten Funktionsvielfalt von LPA liegt es auf der Hand, dass es ein filigran austariertes System zwischen der de novo Synthese und dem Abbau von bioaktivem LPA geben muss. Dieses Gleichgewicht wird auf der Produktionsseite von lysoPLD/ATX (Tokumura et al., 2002, Sano et al., 2002, Ferry et al., 2003, Umezu-Goto et al., 2002) und auf der Degradationsseite durch membranständige Lipidphosphatasen erreicht (van Meeteren and Moolenaar, 2007). Frühere Modelle der LPA-Synthese gingen davon aus, dass größere Mengen von LPA intrazellulär durch zytosolische Phospholipasen (Phospholipase A1 oder A2) (Hiramatsu et al., 2003, Fourcade et al., 1995) hydrolytisch aus Phospholipiden gebildet werden und entsprechend anderer Hormone oder Mediatoren sezerniert werden (van Meeteren and Moolenaar, 2007). Diese Vermutung konnte allerdings bisher für keinen physiologischen Vorgang bestätigt werden. Einzig bei der Entzündung scheint lösliche Phospholipase A2 (sPLA2) aus äußeren

Zellmembrananteilen oder Vesikeln LPA produzieren zu können (Neidlinger et al., 2006, Fourcade et al., 1995). Entgegen früherer Annahmen spielt sich die LPA Homeostase also extrazellulär ab. Deshalb scheint die Internalisation der LPA-Rezeptoren beim Abebben der Zellantwort eine größere Rolle zu spielen als die Degradation des Substrats LPA durch Lipidphosphatasen (van Meeteren and Moolenaar, 2007).

## **2.2 LPA-Rezeptoren**

Sechs LPA-spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, LPA1-6 (Chun et al., 2010), sind bis heute bekannt. Diese Rezeptoren unterteilen sich in zwei Familien. Zu den „klassischen“ Rezeptoren zählen LPA 1-3 (van der Bend et al., 1992, Hecht et al., 1996). Sie entstammen der sogenannten „edg“ (endothelial differentiation gene) Subfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und zeichnen sich durch eine mindestens 50%-ige Sequenzübereinstimmung untereinander aus (Choi et al., 2010). Fünf weitere G-Protein gekoppelte Rezeptoren dieser Subfamilie zeichnen sich durch eine Spezifität für das ebenso bioaktive Phospholipid Sphingosin-1-phosphat (S1P) aus (Anliker and Chun, 2004, Chun et al., 2002). Die drei später entdeckten LPA-Rezeptoren LPA4 (vorher GPR23/p2y9) (Noguchi et al., 2003, Lee et al., 2007a, Yanagida et al., 2007), LPA5 (vorher GPR92) (Kotarsky et al., 2006, Lee et al., 2006) und LPA6 (vorher P2Y5) (Yanagida et al., 2009, Chun et al., 2010) entstammen nicht der „edg“ Subfamilie, sondern sind mit den P2Y Nukleotidrezeptoren verwandt. Diese Tatsache lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass die LPA-Rezeptoren aus verschiedenen Ursprungsgenen entstanden sind. Die große Funktionsvielfalt von LPA lässt sich allerdings nicht nur über die Anzahl der Rezeptoren, sondern auch über die große Variabilität der bisher bekannten G-Protein gekoppelten Signalwege erklären (Moolenaar, 1999). Zusätzlich ist für LPA bekannt, dass es nicht nur über die klassischen G-Protein gekoppelten „second messenger“ Signalwege interagiert, sondern auch über GTPasen der Ras und Rho Familie der kleinen G-Proteine wirkt. LPA1 ist der am weitesten verbreitete und am besten erforschte Rezeptor, dem gegenüber haben LPA2 und LPA3 ein etwas limitierteres Verteilungsmuster (Contos et al., 2000, Choi et al., 2010). LPA4 wurde bisher nur in Ovarialepithel in signifikanten Mengen nachgewiesen (Noguchi et al., 2003). Alle LPA-Rezeptoren zeichnen sich durch eine schnelle ligandeninduzierte Rezeptorinternalisation von der Zellplasmamembran aus (Murph et al., 2003, Van Leeuwen et al., 2003). Auch konnte bisher gezeigt werden, dass eine LPA-Rezeptoraktivierung nicht nur von der vorhandenen LPA-Menge, sondern auch von den LPA-Bindungsproteinen abhängt. An Albumin gebunden kann LPA die Rezeptoren LPA1 und LPA2, nicht aber LPA3 aktivieren (Hama et al., 2002). Auf der anderen Seite kann LPA in Samenflüssigkeit, welche vergleichsweise niedrige Albuminkonzentrationen enthält, LPA3, nicht aber LPA1 und LPA2 aktivieren (Hama et al., 2002).

## 2.3 Funktion und Pathophysiologie

Die Liste der biologischen Aktivitäten von LPA ist lang (Tabelle 1) und teilt sich in schnelle und langsame Zellantworten auf. Zu den kurzfristigen und schnellen Antworten zählen morphologische Zellveränderungen, Chemotaxis, Zellmotilitätsveränderungen und Invasion, Gap-junction Verschluss und das Lösen von Tight-junctions. Diese kurzfristigen Effekte sind unabhängig von der basalen Zellproteinsynthese.

Die langfristigen Effekte durch LPA beruhen auf einer veränderten Gen-Transkription. Hierzu zählen die Zellzyklusprogression, Apoptoseverhinderung, Unterstützung der Wundheilung, Produktion von Endothelin und VEGF (vascular endothelial growth factor), die Produktion von IL6, IL8 und GRO1, Angiogenese, die Produktion und Aktivierung von Proteasen wie Urokinase Plasminogen Activator (uPA) und Metalloproteinasen (MMP-2). Bei der Wundheilung wirkt LPA als Agonist. Es stimuliert die Proliferation und Migration von mesenchymalen Stromazellen und Epithelzellen. Freigesetzt in beschädigten Arealen wirkt es vasokonstriktiv und erhöht die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen, welche eine wichtige Rolle in der Gewebsreparatur spielen (Balazs et al., 2001, Sturm and Dignass, 2002). Wie weiter oben schon erwähnt, wird LPA auch von aktivierten Plättchen freigesetzt und bewirkt im Sinne eines positiven Feedbacks eine weitere Aktivierung von Plättchen (Haseruck et al., 2004). Für lokal aufgetragenes LPA konnte eine positive Beeinflussung der Heilung verletzter Haut (Balazs et al., 2001, Balazs et al., 2000) und im Rattenmodell eine beschleunigte Endothelialisierung für rektal appliziertes LPA gezeigt werden (Sturm and Dignass, 2002). Auch wird für LPA als positiver Einflussfaktor der Epithelheilung des oberen Gastrointestinaltraktes vermutet, da es in physiologischen Konzentrationen im Speichel vorkommt (1 $\mu$ M) und mitogen auf Epithelzellen der Zunge, Ösophagus und Larynx wirkt (Sugiura et al., 2002).

Neben der Transkriptionsbeeinflussung ist LPA über seine G-Protein gekoppelten Rezeptoren zu einer Transaktivierung von EGF (Epidermal growth factor) -Rezeptoren fähig. Die Wirkung von LPA ist nicht strikt auf eine Überlebensstimulation festgelegt, welches seine Rolle in der neurobiologischen Entwicklung zeigt. In Hippocampusneuronen und neuronalen PC12-Zellen kann LPA sogar im Gegenteil Apoptose induzieren oder führt in manchen Fällen zur Nekrose. Ursprünglich wurde LPA nur als ein extrem potenter Induktor einer Neuritenretraktion und als ein Induktor eines „growth cone“ Kollapses an neuronalen Zellen beschrieben (Jalink et al., 1994, Tigyi and Miledi, 1992). Später konnte diese Rolle von LPA auch „in vivo“ für primäre Neurone und kortikale Neuroblasten gezeigt werden (Fukushima et al., 2000, Campbell

and Holt, 2001, Yuan et al., 2003). Für Astrozyten im Hirnstamm konnte unter LPA-Einfluss das Einsetzen der sogenannten „stellation“ gezeigt werden, ein in manchen Situationen notwendiger Gerüstumbau der Astrozyten (Ramakers and Moolenaar, 1998). Experimente mit kortikalen Neuroblasten lassen für LPA eine wichtige Rolle mit neurotransmitterähnlicher Funktion während der Hirnentwicklung vermuten (Dubin et al., 1999). Auch kann es die Exzitationsfähigkeit von Nervenzellmembranen über Beeinflussung eines Chloridkanals modulieren (Postma et al., 1996, Postma et al., 2001). Weiterhin wird für LPA eine Rolle in der Steuerung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke über die Beeinflussung von „Tight-junctions“ beschrieben (Schulze et al., 1997).

Die Verknüpfung von Autotaxin mit LPA klassifiziert LPA mit seinen zugehörigen Rezeptoren als Schlüsselemente in der Metastasierungskaskade (siehe Abbildung 2). Eine intensive Erforschung findet die Rolle von LPA bei Krebserkrankungen. So wurden stark erhöhte LPA-Level in Aszites von Ovarialkrebspatientinnen nachgewiesen. In Zellkulturexperimenten konnte die Existenz von autokrinen LPA-Aktivierungsschleifen für Ovarial- und Prostatakarzinomzellen gezeigt werden (Shen et al., 1998, Fang et al., 2002, Mills et al., 2002, Xie et al., 2002, Mills and Moolenaar, 2003, Sengupta et al., 2003). Daher wird, im Zusammenhang mit einer veränderten LPA-Rezeptorexpression, für LPA eine wichtige Rolle als Regulator in der Pathophysiologie von malignen Erkrankungen angenommen (Goetzl et al., 1999, Fang et al., 2002, Mills et al., 2002).

**Tabelle 2: Biologische Hauptaktivitäten von LPA, modifiziert nach (Houben and Moolenaar, 2011, Moolenaar, 1999, Moolenaar et al., 2004, van Meeteren and Moolenaar, 2007)**

Effekt	Zelltyp/Anmerkungen
Proliferation	Viele normale und mutierte Zelltypen (Moolenaar, 1995, Moolenaar et al., 1997)
Überlebensstimulation	Schwanzzellen, Leukozyten, renale Tubuluszellen, gastro-intestinales Epithel, Osteo-blasten, Mesangiumzellen, Hepatozyten (Moolenaar, 1999, Moolenaar et al., 2004, van Meeteren and Moolenaar, 2007)
Migration	Diverse normale und mutierte Zelltypen, Leukozyten (Jalink et al., 1993, Moolenaar, 1994, Moolenaar, 1999, Moolenaar et al., 2004)
Tumorprogression	Beschriebene LPA-Rezeptor Über- oder Unterexpression in xenotransplantierten Mäusen (Houben and Moolenaar, 2011)
Tumorinvasion (in vitro)	Hepatozelluläres Karzinom, T-Zell Lymphom, Karzinome (Moolenaar, 1999)
Wundheilung (in vivo)	Haut, gastrointestinales Epithel (Balazs et al., 2000, Balazs et al., 2001, Sturm and Dignass, 2002)
Kontraktion	Myofibroblasten, glatte Muskulatur
Plättchenaktivierung und Aggregation	Synergistisch mit ADP, LPA in atherosklerotischen Plaques
Zytokinproduktion (CCL2/MCP-1, IL-1b, IL3, IL6, IL-8/CXCL8, CXCL1/Gro-alpha, GM-CSF)	Fibroblasten, Astrozyten, Leukozyten, Epithelzellen, Endothelzellen, Karzinomzellen
Vaskuläres Remodeling (Unterstützung der Ausbildung von Neointima)	Rattenmodell für A. carotis (Yoshida et al., 2003, Zhang et al., 2004)
Dedifferenzierung	Primäre Neurone (Neuriten-retraktion, Rückbildung von „growth cones“), Neuroblastome und Gliome (Verhinderung des Neuritenwachstums), Astrozyten (Einkugelung), glatte Gefäßmuskulatur (Konversion zu Fibroblasten), Pre-Adipozyten (Hayashi et al., 2001, Fukushima et al., 2000, Ramakers and Moolenaar, 1998)
Depolarisation	Membrandepolarisation von Neuronen und Fibroblasten (Chloridionenausstrom) (Dubin et al., 1999, Postma et al., 1996, Postma et al., 2001)]
Implantation	LPA3 vermittelte Blastozystenimplantation

Auch die Entdeckung von Autotaxin, einem schon bekannten Metastasierungsfaktor, als LPA produzierendes Enzym, unterstützt die These einer signifikanten Rolle von LPA bei der malignen Progression. Wie schon weiter oben erwähnt, unterscheiden sich die Effekte von LPA stark durch die Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren. So konnte für LPA2 eine Rolle in Proliferation, Migration und Metastasierung von gynäkologischen Tumoren *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (Yu et al., 2008, Hope et al., 2009). Eine Hochregulierung für LPA2 in Ovarialkarzinomen ist bekannt, dabei reagiert der Rezeptor auf LPA Konzentrationen weit unterhalb der basalen Serumkonzentration, womit der tumorgene Effekt von LPA eher über die Rezeptor- als über die Ligandenkonzentration gesteuert wird (Goetzl et al., 1999).

Auch LPA1 und LPA3 spielen eine Rolle in pathologischen LPA Aktivitäten. Eine genetische und pharmakologische Inhibierung von LPA1 führte zu einer Reduzierung der Proliferationsrate und Metastasierungstendenz von Ovarial- und Mammakarzinomzellen „*in vitro*“ und „*in vivo*“ (Boucharaba et al., 2006). LPA2 ist hingegen mit einer erhöhten Tumoraggressivität von Ovarialkarzinomen verbunden (Yu et al., 2008). Auch für gastrointestinale Tumore spielt LPA eine außerordentliche Rolle. Über LPA1 und LPA2 stimuliert LPA primär die Proliferations-, Migrations- und Invasionsneigung von Kolonkarzinomzellen (Yun et al., 2005, Shida et al., 2003, Rusovici et al., 2007). Eine genetische Ausschaltung von LPA2 führt zu einer Abschwächung solider Tumorbildung „*in vivo*“ (Lin et al., 2010). Andere Tumore, für die ein Zusammenhang mit LPA vermutet wird, umfassen Mammakarzinome, Bronchialkarzinome, Prostatakarzinome, Mesotheliome und Gliome (Hao et al., 2007, Kishi et al., 2006, Kitayama et al., 2004, Murph et al., 2007, Yamada et al., 2008). Neben der gezeigten direkten Unterstützung der Proliferation und Metastasierung von Tumoren ist eine weitere wichtige Rolle von LPA in der Tumorgenese der proangiogenetische Effekt. Für eine Reihe von Krebszellen konnte gezeigt werden, dass eine LPA Stimulation eine Sekretion von vascular endothelial growth factor bewirkt und somit die für Tumoren wichtige Gefäßneubildung ermöglicht (Hu et al., 2001). LPA6 spielt eine Sonderrolle, da für diesen Rezeptor eine Tumorsupressorfunktion bei Blasenkarzinomen gezeigt werden konnte (Lee et al., 2007b, Majewski et al., 2008).

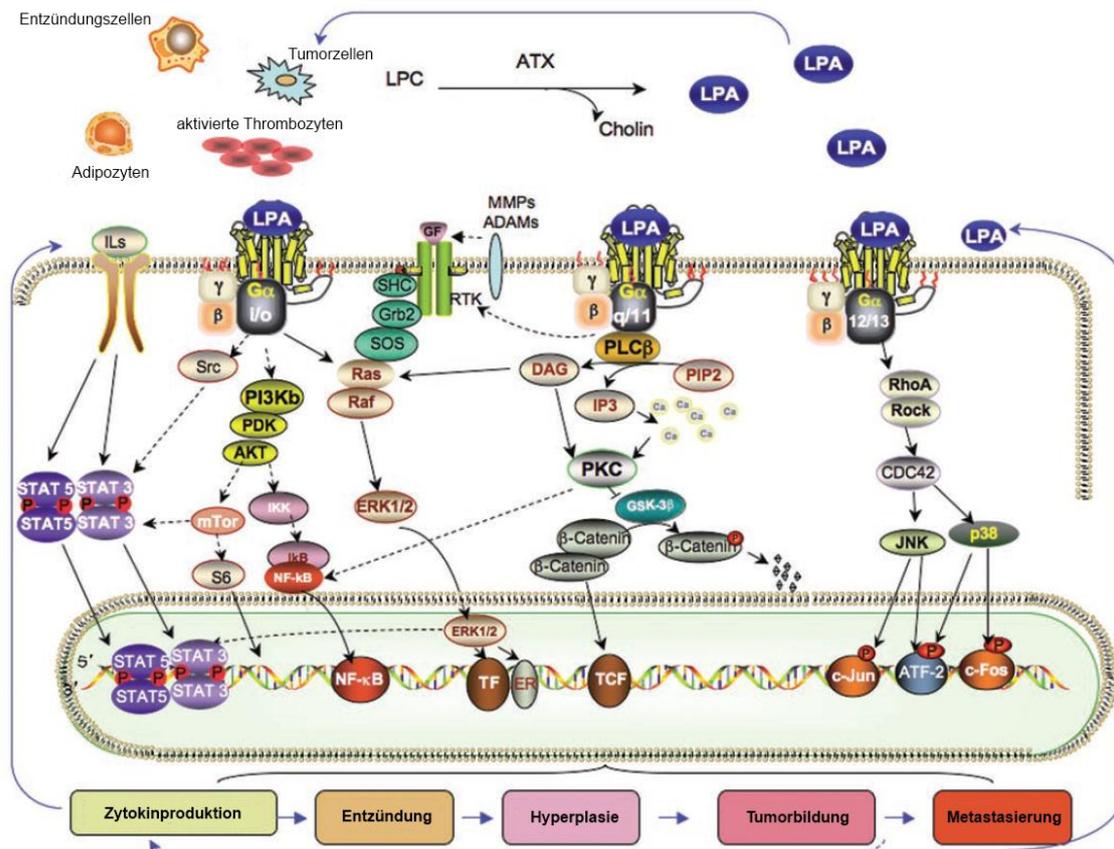


Abbildung 2: Grafische Darstellung für LPA und seine Hauptsignalwege für die Verknüpfung von Entzündungsreaktion und Tumorgenese/Metastasierung. ATX hydrolysiert frei verfügbares Lysophosphatidcholin (LPC) zu bioaktiven LPA. LPA wirkt über seine Rezeptoren an mindestens drei verschiedenen Klassen von heterotrimeren G-Proteinen (Gq, Gi und G12/13). Diese wiederum aktivieren ihre zugehörigen Signalkaskaden. Darunter die Aktivierung der Src-STAT und der PI3Kb Signalkaskade durch Gi und die RhoA/Rock Signalkaskade durch G12/13. Die darüber gebildeten Transkriptionsfaktoren STAT3, NF $\kappa$ B und ATF-2 induzieren unter anderem Zellproliferation und Zytokinproduktion. Gebildete Zytokine triggern zusätzlich eine autokrine Verstärkung der angestoßenen Signalkaskaden, so dass es zu entkoppelter Proliferation und Metastasierung kommt. Grafik nach (Liu et al., 2009a).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material und Probengewinnung**

#### **3.1.1 Humane Zelllinien**

Fünf humane kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien, drei humane Melanomzelllinien, zwei humane Mammakarzinomzelllinien, drei humane Kolonkarzinomzelllinien und die Nicht-Tumorzelllinie HUVEC wurden zur relativen Quantifizierung ihrer LPA 1, LPA2 und LPA3 Rezeptoren verwendet. Die Melanomzelllinien MV3 und MeWo wurden durch die Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland bereitgestellt, die Zelllinie FEMX-1 durch Prof. Dr. Oystein Fodstad (Universität Oslo, Norwegen). Die kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien H69, SW2, OH1, OH3 und H82 wurden durch Prof. Dr. Uwe Zangemeister-Wittke (Universität Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die Mammakarzinomzelllinien MCF7, HBL100 und die Kolonkarzinomzelllinien HT29, HT29mdr und SW480 wurden von der „European Collection of Animal Cell Cultures“ (Porton Down, Wiltshire, Großbritannien) bezogen. Eine Zusammenfassung der Zelllinieneigenschaften findet sich in der Tabelle 3. Routinemäßig wurde für alle Zelllinien ein Mykoplasmascreening durchgeführt. Für alle Versuche wurden nur mykoplasmenfreie Zellen verwendet.

**Tabelle 3: In den Versuchen verwendete Zelllinien und Tumore**

<b>Zelllinie</b>	<b>Zelllinienherkunft</b>	<b>Metastasierung in SCID-Mäusen</b>
Mammakarzinom		
MCF7	Pleuraergusspunktat einer Patientin mit Mammakarzinom	+
HBL100	Muttermilchzellen; Teile des SV40 Genoms integriert, von daher weder als normale, noch als Krebszelllinie einzuordnen.	-
Kolonkarzinom		
HT29	Adenokarzinomzellen aus Primärtumor	+
HT29mdr	Multi-Drug Resistance Phänotyp von HT29 Zellen	-/+
SW480	Adenokarzinom aus Primärtumor, Grade 3-4	+
Melanom		
FEMX-1	Melanomzellen aus Lymphknotenmetastase	+
MV-3	Melanomzellen aus Lymphknotenmetastase	+
MeWo	Melanomzellen aus Lymphknotenmetastase	+
Kleinzelliges Bronchialkarzinom		
OH1	Pleurapunktat eines 43-jährigen männlichen Patienten	+
OH3	Pleurapunktat eines 43-jährigen männlichen Patienten	+
H69	Pleurapunktat eines 56-jährigen männlichen Patienten	+
H82	Pleurapunktat eines 56-jährigen männlichen Patienten	+
SW2	Knochenmarkaspirat eines metastasierten Bronchialkarzinompatienten	+

### **3.1.2 HUVEC**

Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden zur Kontrolle der Expression von LPA-Rezeptoren auf nicht-malignen Zellen im Vergleich zu Tumorzellen verwendet. Die Zellen wurden durch die PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland) bereitgestellt. Für die Kultivierung der Zellen wurde das DetachKit derselben Firma verwendet. Auch hier wurde routinemäßig ein Mykoplasmascreening durchgeführt. Für alle Versuche wurden nur mykoplasmenfreie Zellen verwendet.

### **3.1.3 Zellkultur**

Die Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium (L-Glutamin und 2 g Glucose/l, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % Kälberserum (FCS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 10.000 µl/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei maximaler Kulturschalenbedeckung wurden die Zellen zur RNA-Isolierung mit PBS (50 mM Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Trypsinierungsreaktion wurde wieder mit RPMI 1640 Medium gestoppt. Die Zellpelletgewinnung zur Weiterverarbeitung erfolgte durch Zentrifugation bei 1500 Upm für drei Minuten.

### **3.1.4 Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Mausgewebe**

Als Kontrolle wurde unbeimpften SCID (severe combined immunodeficiency) Mäusen Gewebe entnommen. Hierbei wurden Lunge, Leber, Muskel und Fettgewebe verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Tumoren wurde das Mausgewebe vor der RNA-Extraktion mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

### **3.1.5 Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Tumore**

Zum in vivo Vergleich wurde aus in SCID Mäusen herangewachsenen Tumoren der genannten Zelllinien RNA isoliert. Für die Anzüchtung wurden den Mäusen Kulturzellen zwischen die Schulterblätter injiziert. Nach Erreichen einer Größe von mindestens 10 % des Mausgewichtes wurden die Tumore entnommen, formalinfixiert und in Paraffin eingebettet.

### **3.1.6 RNA-Isolation**

Zur Isolation von RNA aus den in Zellkultur gewachsenen Zelllinien und aus in Paraffin eingebetteten, formalinfixierten Tumoren kamen zwei verschiedene RNA-Isolationskits der Firma Qiagen zum Einsatz. Die Isolationsprinzipien der beiden Kits sind ähnlich. In mehreren Wasch- und Elutionsschritten wird die RNA entweder aus einem Zellysate oder aus Paraffinschnitten isoliert. Hierbei wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

#### **3.1.6.1 RNA-Isolation aus Zelllinien**

Für die RNA-Isolation aus Zelllinien wurde das „RNeasy Midi-Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Mit dem Kit kann ein Ausgangsmaterial von einer Minimalanzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet werden. Die RNeasy Midi Säulen können maximal 1 mg RNA binden, welche eine Mindestlänge von 200 Basen haben muss. Alle Ribonukleinsäuren, die kleiner als 200 Basen sind (rRNA, tRNA, 5sRNA), werden nicht erfasst und ausgewaschen. Wie erwünscht wurde so mRNA angereichert. Den Großteil der gewonnenen RNA machten aber 18s und 28s Untereinheiten der Ribosomen aus, da diese mengenmäßig am meisten in intakten Zellen vertreten sind. Durch die hohe quantitative Anzahl dieser Untereinheiten konnte eine erfolgreiche RNA-Isolation aus den Zelllinien durch eine Darstellung der RNA auf 1 % Agarosegel bestätigt werden. Die Zellen wurden bei  $3000 \times g$  abzentrifugiert und der Überstand aspiriert. Im Folgenden wurde gemäß den Herstellerangaben weiter verfahren. Je nach zu erwartender RNA Menge wurden am Ende 150-250  $\mu$ l RNase freies Wasser zur Elution der RNA aus der Säule benutzt. Es wurde zweimalig eluiert. Zunächst mit 125  $\mu$ l RNase freien Wasser, anschließend noch einmal mit 25-125  $\mu$ l RNase freien Wassers.

#### **3.1.6.2 RNA-Isolation aus Tumoren**

Zur RNA-Isolation aus in Paraffin eingebetteten, formalinfixierten Tumoren wurde das „RNeasy FFPE Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Dieses Kit ist dafür ausgelegt, ohne weitere Degradation, den größten Teil der durch Formaldehyd verursachten Veränderungen an der RNA rückgängig zu machen. Da durch eine Formalinfixierung vorhandene RNA aber nicht nur degradiert, sondern auch fragmentiert wird, ist das Kit nicht optimal für Versuche, die ganze, unfragmentierte RNA voraussetzen. Daher kam das Kit nur für die RNA-Isolation aus eingebetteten Tumoren infrage. Als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation wurden jeweils acht frisch geschnittene, 10  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte eines Tumors verwendet. Um eine ausreichende Menge an RNA zu gewinnen, wurden jeweils drei Ansätze pro Tumor hergestellt. Möglichen Verunreinigungen der Arbeitsfläche und des Materials wurde durch eine intensive Reinigung mittels „RNase away“ vorgebeugt. Um den Paraffinüberschuss

gering zu halten, wurden tumorfreie Bereiche der Einbettungsblöcke mithilfe eines sterilen Skalpells entfernt. Die ersten 10 Schnitte wurden stets verworfen, um die Kontaminationsgefahr weiter zu vermindern. Die Elution der RNA aus dem so gewonnenen Material erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll von Qiagen. Nach Elution der RNA wurden die drei Ansätze eines Tumors zusammengeführt, sodass pro Tumor jeweils ca. 90 µl gelöste RNA vorlagen.

### **3.1.6.3 Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration der RNA wurde spektrofotometrisch (Smart Spec 2000™) bestimmt. Zum Befüllen der Fotometerzelle wurde 1 µl der zuvor extrahierten RNA noch unbekannter Konzentration bei einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. So kamen 100 µl verdünnte RNA-Lösung zum Einsatz. Das Spektralfotometer wurde vor der eigentlichen Messung mit destilliertem Wasser geeicht. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte bei einer Wellenlänge 260 nm, 280 nm und bei 320 nm. Dabei repräsentiert die Messung bei 280 nm die durchschnittliche Absorption der Proteine, reine RNA absorbiert bei 260 nm und die Messung bei 320 nm diente als Verunreinigungsreferenz für das Spektralfotometer. Anhand der Absorption des Lichtes kann das Gerät die Konzentration der RNA in der Lösung ermitteln und gibt dies in µg/ml an. Da wir zu Beginn der Messung die eigentliche RNA-Lösung verdünnt haben, musste der hier ermittelte Wert noch mit dem Faktor 100 multipliziert werden, um die richtige Konzentration zu erhalten. Aus praktischen Gründen wurden die Werte noch in ng/µl umgerechnet.

### **3.1.7 cDNA Synthese**

Die cDNA (complementary DNA) Synthese erfolgte mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Roche. Das Kit stellt zwei verschiedene Arten von Primern zur Verfügung. Random Hexamer Primer sind Primer, die aus sechs zufälligen Nucleotiden zusammengesetzt sind und unspezifisch an den mRNA-Strang binden. Sie gewährleisten eine relativ gleichmäßige Repräsentation aller RNA Sequenzen und ermöglichen das Umschreiben fragmentierter mRNA Sequenzen. Solche Sequenzen liegen häufiger bei schon degradiertem mRNA vor, wie sie hier aus den fixierten Tumoren gewonnen wurde. Spezifischere Primer für die reverse Transkription sind die vom Kit bereitgestellten Anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> Primer. Diese binden komplementär an den poly-A Schwanz der mRNA und ermöglichen die reverse Transkription ganzer, nicht degradiertem mRNA Abschnitte. Im Gegensatz zu den Random Hexamer Primern erhält man dadurch vollständige cDNA und weniger Einzelfragmente. Wie schon erwähnt, ist ihr Einsatz aber auf wenig bis kaum degradierte mRNA beschränkt. Diese Primer

wurden bei der Transkription der aus Zelllinien gewonnenen mRNA verwendet. Für das Umschreiben aus mRNA der verschiedenen Zelllinien wurden abweichend von den Herstellerempfehlungen zur Optimierung der cDNA Ausbeute immer 1500 ng mRNA eingesetzt. Das notwendige Volumen wurde anhand der RNA-Konzentrationsbestimmung ermittelt. Das Syntheseprotokoll wurde gemäß den Angaben von Roche durchgeführt. Für die reverse Transkription der RNA aus den in Paraffin eingebetteten Tumoren wurde das Verfahren nochmals leicht modifiziert. Durch den hohen Degradationsgrad der RNA, mit möglichen Verlust des poly-A Schwanzes, benutzten wir hier die random Hexamer Primer und setzten immer die für die Tumorzelle gewonnene unverdünnte Menge an RNA ein. Anschließend wurde auch hier gemäß den Herstellerempfehlungen weiter verfahren. Die Negativprobe durchlief die gleichen Syntheseschritte wie die Positivproben, aber ohne Zugabe des Enzyms reverse Transkriptase. Die Negativproben dienten der Sicherstellung, dass bei der Synthese nur mRNA und keine genomische DNA in cDNA umgeschrieben, bzw. in der PCR amplifiziert wurde.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Schmelzkurvenanalyse

Zur genauen Bestimmung der erhaltenen PCR-Produkte wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Der Schmelz- oder Denaturierungspunkt ist für jede dsDNA Sequenz spezifisch und hängt vom Guanin und Cytosinegehalt sowie der Länge und der Sequenz einer DNA ab. Die Schmelzkurve wurde mittels des LightCyclers 2.0 nach jeder PCR bestimmt. Die Temperatur wurde hierfür kontinuierlich von 65 °C auf 95 °C (0,1 °C/s) erhöht. Bis zur spezifischen Denaturierungstemperatur eines PCR-Produktes kann sich der unspezifische Farbstoff SYBR Green I in die dsDNA einlagern. Beim Überschreiten des Schmelzpunktes kommt es zu einem plötzlichen Fluoreszenzabfall. Die Fluoreszenz gegen die Temperatur in Grad Celsius aufgetragen ergibt die absteigende Schmelzkurve eines PCR-Produktes. Die LightCycler Software stellt hiervon die erste negative Ableitung dar, sodass eine Parabel (ein „Peak“) bei der entsprechenden Schmelztemperatur eines Amplifikates entsteht (siehe Abbildung 3). Dies erleichtert den Vergleich verschiedener Schmelzkurven.

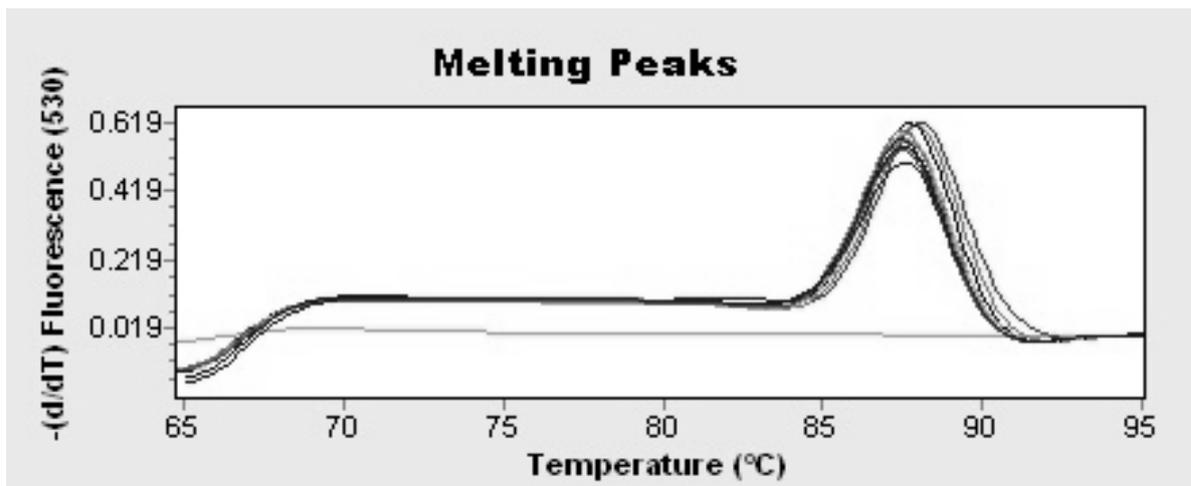


Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der einheitlichen LightCycler PCR Schmelzkurven anhand der Standardreihe für LPA2

### 3.2.2 PCR: Ansatz und Protokolle

#### 3.2.2.1 Primer

Gen		Sequenz	Tm
Aktin	Vorwärts a	5'- aga aaa tct ggc acc aca cc -3'	57,3 °C
	Vorwärts b	5'- cca acc gcg aga aga tga -3'	56,0 °C
	Rückwärts	5'- cca gag gcg tac agg gat ag -3'	61,4 °C
LPA1	Vorwärts a	5'- tag ttc tgg ggc gtg ttc ac -3'	59,4 °C
	Vorwärts b	5'- gcg tgt tca cca cct aca ac -3'	59,4 °C
	Rückwärts	5'- tgt ggt tca ttc atg gct gt -3'	55,3 °C
LPA2	Vorwärts a	5'- tac cga gag acc acg ctc a -3'	58,8 °C
	Vorwärts b	5'- cag cct ggt caa gac tgt tgt -3'	59,8 °C
	Rückwärts	5'- tgc agg act cac agc cta aa -3'	57,3 °C
LPA3	Vorwärts a	5'- ata caa gtg ggt cca tca gc -3'	57,3 °C
	Vorwärts b	5'- acg gtg atg act gtc tta ggg -3'	59,8 °C
	Rückwärts	5'- cac ctt ttc aca tgc tgc ac -3'	57,3 °C

### 3.2.2.1.1 PCR-Produkte

Gen	Kombinierte Primer	Produkt	Länge
Aktin	Vorwärts a + Rückwärts	5'-aga aaa tct ggc acc aca cct tct aca atg agc tgc gtg tgg ctc ccg agg agc acc ccg tgc tgc tga ccg agg ccc ccc tga acc cca agg cca acc gcg aga aga tga ccc aga tca tgt ttg aga cct tca aca ccc cag cca tgt acg ttg cta tcc agg cta tgc tat ccc tgt acg cct ctg g-3'	190 bp
	Vorwärts b + Rückwärts	5'-cca acc gcg aga aga tga ccc aga tca tgt ttg aga cct tca aca ccc cag cca tgt acg ttg cta tcc agg cta tgc tat ccc tgt acg cct ctg g-3'	97 bp
LPA1	Vorwärts a + Rückwärts	5'-agt tct ggg gcg tgt tca cca cct aca acc aca gag ctg tca tgg ctg cca tct cta ctt cca tcc ctg taa ttt cac agc ccc agt tca cag cca tga atg aac cac a-3'	110 bp
	Vorwärts b + Rückwärts	5'-gcg tgt tca cca cct aca acc aca gag ctg tca tgg ctg cca tct cta ctt cca tcc ctg taa ttt cac agc ccc agt tca cag cca tga atg aac cac a-3'	100 bp
LPA2	Vorwärts a + Rückwärts	5'-tac cga gag acc acg ctc agc ctg gtc aag act gtt gtc atc atc ctg ggg gcg ttc gtg gtc tgc tgg aca cca ggc cag gtg gta ctg ctc ctg gat ggt tta ggc tgt gag tcc tgc a-3'	121 bp
	Vorwärts b + Rückwärts	5'-cag cct ggt caa gac tgt tgt cat cat cct ggg ggc gtt cgt ggt ctg ctg gac acc agg cca ggt ggt act gct cct gga tgg ttt agg ctg tga gtc ctg ca-3'	104 bp

LPA3	Vorwärts a + Rückwärts	5'-ata caa gtg ggt cca tca gcc gcc gga gga cac cca tga agc taa tga aga cgg tga tga ctg tct tag ggg cgt ttg tgg tat gct gga ccc cgg gcc tgg tgg ttc tgc tcc tcg acg gcc tga act gca ggc agt gtg gcg tgc agc atg tga aaa ggt g-3'	163 bp
	Vorwärts b + Rückwärts	5'-acg gtg atg act gtc tta ggg gcg ttt gtg gta tgc tgg acc ccg ggc ctg gtg gtt ctg ctc ctc gac ggc ctg aac tgc agg cag tgt ggc gtg cag cat gtg aaa agg tg-3'	113 bp

### 3.2.2.1.2 Thermo-PCR

Jede Thermo-PCR wurde über 35 Zyklen durchgeführt. Als Primerkombination wurden jeweils ein Vorwärts a und ein Rückwärts Primer des entsprechenden Gens eingesetzt. Die von Hand pipettierte Menge ist Tabelle 4: Thermo-PCR Reaktionsansatz zu entnehmen. Die Annealing-Temperatur variierte je nach verwendetem Primer (siehe Tabelle 6). Zur Ermittlung der Annealing-Temperatur wurde folgendes Vorgehen gewählt: Es wurde das arithmetische Mittel aus der Schmelztemperatur des Vorwärts a und Rückwärts Primers eines Gens ermittelt. Anschließend wurden 5 °C von dieser Temperatur abgezogen, da sich dieser Wert als günstigster Ausgangswert für nachfolgende Probeläufe erwies. Ausgehend von dieser Temperatur wurde dann die Annealing-Temperatur in Probeläufen angepasst, bis sich in einer Agarose-Gelelektrophorese Überprüfung ein sauberes Produkt ohne zusätzliche Banden nachweisen lies. Das Produkt aus Vorwärts a und Rückwärts Primer eines Gens wurde bei der Erstellung der Standardkurve im Rahmen einer Semi-nested PCR weiterverwendet.

**Tabelle 4: Thermo-PCR Reaktionsansatz**

Thermo-PCR 20µl Ansatz	Menge (µl)
Puffer	2
Vorwärts Primer	0,1
Rückwärts Primer	0,1
Nukleotide	0,4
Polymerase	0,1
H <sub>2</sub> O	15,3
DNA	2
<hr/>	
	20 µl

**Tabelle 5: Protokoll Thermo-PCR 35 Zyklen**

Zeit	Temperatur
30 sek	94 °C
30 sek	Variabel
60 sek	72 °C

**Tabelle 6: Annealingtemperaturen der verschiedenen Vorwärts-Primer der Thermo-PCR**

Primer	Annealing-Temperatur
LPA1 Vorwärts a	54 °C
LPA2 Vorwärts a	57 °C
LPA3 Vorwärts a	55 °C

### 3.2.2.1.3 RTQ-PCR

Jede RTQ-PCR wurde im LightCycler 2.0 von Roche durchgeführt. Es wurde jeweils ein 50 µl Ansatz in 100 µl Kapillaren eingesetzt. Als Primerkombination wurden ein Vorwärts b und ein Rückwärts Primer des entsprechenden Gens eingesetzt. Die von Hand pipettierte Menge ist Tabelle 7: RTQ-PCR Reaktionsansatz zu entnehmen. Die Annealing Temperatur variierte je nach verwendetem Primer (siehe Tabelle 9). Zur Ermittlung der Annealing-Temperatur wurde folgendes Vorgehen gewählt: Es wurde das arithmetische Mittel aus der Schmelztemperatur des Vorwärts a und Rückwärts Primers eines Gens ermittelt und anschließend 5 °C auf diese Temperatur aufgeschlagen. Im Vergleich zur Thermo-PCR erwies sich ein Aufschlagen der genannten Temperatur als günstigster Ausgangspunkt für die Probeläufe. Ausgehend von dieser Temperatur wurde dann die Annealing-Temperatur in Probeläufen angepasst, bis sich in einer Agarose-Gelelektrophorese Überprüfung ein sauberes Produkt ohne zusätzliche Banden nachweisen ließ. Auch war es hier zusätzlich notwendig, die eingesetzte Primermenge zu variieren. Entsprechende Lücken im 50 µl Standardansatz wurden durch H<sub>2</sub>O ausgeglichen. Für LPA1 und LPA3 wurden abweichend vom Standardmastermix 0,5 µl Vorwärts b und Rückwärts Primer eingesetzt. Für LPA2 wurden abweichend 0,25 µl des jeweiligen Primers eingesetzt.

**Tabelle 7: RTQ-PCR Reaktionsansatz**

RTQ-PCR 50µl Ansatz	Menge (µl)
Vorwärts Primer	1
Rückwärts Primer	1
LC-MIX	10
H <sub>2</sub> O	28
DNA	10

**Tabelle 8: Protokoll RTQ-PCR 50 Zyklen**

Programm	Zeit	Temperatur
Denaturierung	10 min	95 °C
Amplifikation	15 sek (Denaturierung)	95 °C
	15 sek (Annealing)	Variabel
	25 sek (Amplifikation)	72 °C
Schmelzkurve	kontinuierlich	65-95 °C (0,1 °C/s)

**Tabelle 9: Annealingtemperaturen der verschiedenen Vorwärts-Primer der RTQ-PCR**

Primer	Annealing-Temperatur
LPA1 Vorwärts b	65 °C
LPA2 Vorwärts b	67 °C
LPA3 Vorwärts b	65 °C

## 4 Ergebnisse

Für die Bestimmung der relativen Expression der LPA-Rezeptoren in den Zelllinien und zugehörigen Tumoren wurde ein PCR-Protokoll für den Thermocycler und eines für den LightCycler etabliert. Im Thermocycler wurde die Funktionsfähigkeit jedes Primerpaares getestet und das Ausgangsmaterial aus „vorwärts a + rückwärts“ Primer für jedes Gen für eine semi-nested PCR im LightCycler gewonnen. Da das Thermocyclerprotokoll nicht auf den Lightcycler übertragbar war, wurde hier erneut ein Protokoll für jedes Gen etabliert. Zur Verwendung kamen hier der „vorwärts b + rückwärts“ Primer der untersuchten Gene. Insgesamt wurden 13 Zelllinien und aus ihnen gewachsene Tumore auf die Expression der LPA-Rezeptoren hin untersucht. Je Zelllinie wurden 3 verschiedene Proben und je Tumor fünf verschiedene Proben untersucht.

### 4.1 RNA-Extraktion

#### 4.1.1 Zelllinien

Die RNA Konzentrationen lagen zwischen 92 ng/μl und 1100 ng/μl, im Mittel bei 700 ng/μl. Eine Überprüfung der extrahierten RNA durch 1%ige Agarose-Gelelektrophorese zeigte eine eindeutige Doppelbande der 18s und 28s RNA und kaum Degradationen der RNA. In der cDNA-Synthese wurden oligo(dt) Primer der Firma Roche eingesetzt.

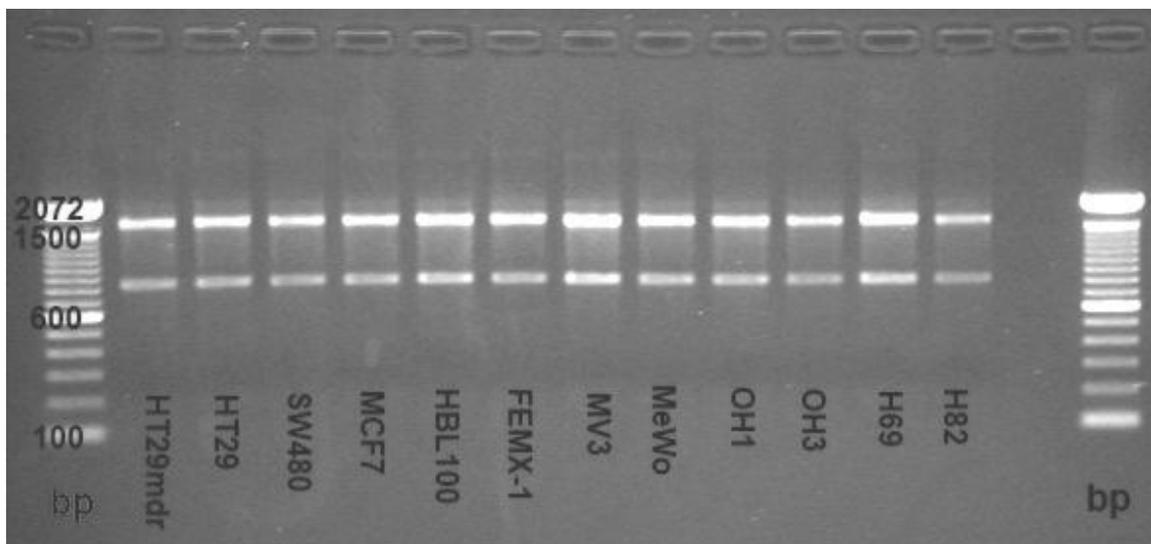


Abbildung 4: Darstellung der effektiven RNA-Extraktion ausgewählter Zellen auf 1%-igen Agarosegel. Die prägnante Doppelbande entsteht durch den hohen Anteil an 28S und 18S RNA im zelleigenen RNA-Pool.

### 4.1.2 Tumore

Die RNA Extraktionskonzentrationen lagen zwischen 100 ng/ $\mu$ l und 4200 ng/ $\mu$ l, im Mittel bei 2500 ng/ $\mu$ l. Eine Überprüfung der RNA-Extraktion durch Agarose Gelelektrophorese ergab, dass größtenteils stark fragmentierte RNA gewonnen wurde. Um genügend verwendbare cDNA aus der fragmentierten RNA zu gewinnen, wurden bei der anschließenden cDNA-Synthese die random Hexamer Primer der Firma Roche verwendet.

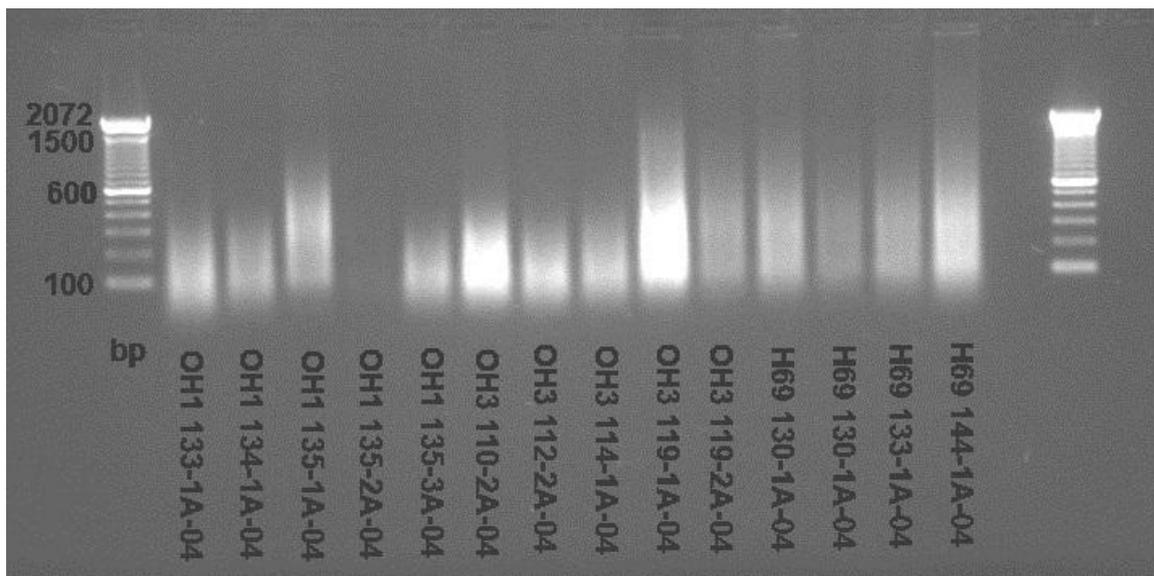


Abbildung 5: Darstellung der effektiven RNA-Extraktion aus in Paraffin eingebetteten Tumoren. Das Verschmieren der Banden im 1%-igen Agarosegel ist Ausdruck der Fragmentierung der extrahierten RNA.

### 4.1.3 Murine Zellen

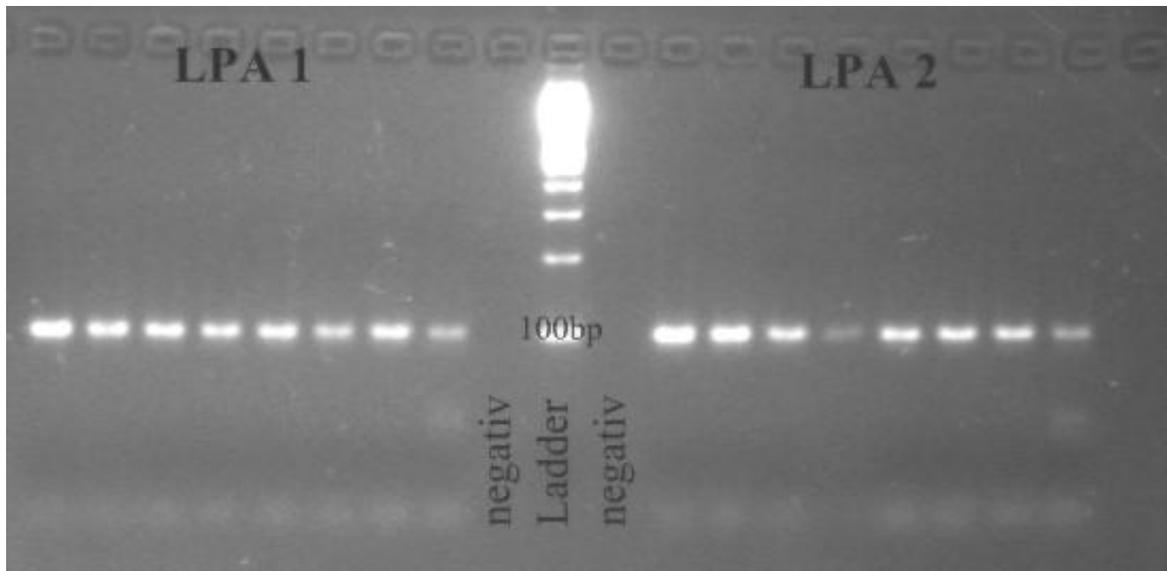
Es wurde RNA aus Lungen-, Leber-, Muskel- und Fettgewebe von zwei unbehandelten SCID-Mäusen isoliert. Für murine Zellen lagen die RNA Extraktionskonzentrationen zwischen 10 ng/ $\mu$ l und 600 ng/ $\mu$ l, im Mittel bei 140 ng/ $\mu$ l. Zusätzlich wurde aus Mausblut RNA gewonnen. Die cDNA Synthese entsprach der Synthese aus Tumor-RNA.

## 4.2 cDNA Synthese

Bei jeder cDNA Synthese wurden zwei Positivproben und eine Negativprobe pro Zelllinie, Tumor oder muriner Zelle angelegt.

## 4.3 Primeroptimierung

Die Primerpaare „vorwärts a + rückwärts“ und „vorwärts b + rückwärts“ des Referenzgens, von LPA1, LPA2 und LPA3, wurden alle vorher in einer Thermocycler-PCR auf ihre Funktionalität und Spezifität getestet.



**Abbildung 6:** Darstellung der Primeroptimierung „vorwärts a + rückwärts“ für die Gene LPA1 und LPA2. Ziel war eine saubere Auftrennung, ohne Doppelbanden oder Restprimermengen. Es wurden zufällige Proben aus Zelllinien und Tumoren für die Etablierung verwendet. Für jedes Gen lief eine H<sub>2</sub>O-Negativprobe mit. Das Produkt von LPA1 hat eine Größe von 110bp und das Produkt von LPA2 eine Größe von 121bp.

### 4.3.1 Effizienzen und Fehler aller Primerpaare nach Standardkurvenerstellung

Tabelle 10: Effizienzen und Fehler aller Primerpaare nach Standardkurvenerstellung

	Aktin vorw. + rückw.	LPA1 vorw. + rückw.	LPA2 vorw. + rückw.	LPA3 vorw. + rückw.
Ansatz	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Primereffizienz	1,931	1,999	1,966	1,875
Fehler	0,0123	0,0082	0,0483	0,0301
Kalibrator	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>

### 4.3.2 Primerspezifität

Um sicherzustellen, dass das Aktin Primerpaar (vorwärts b + rückwärts) spezifisch für humane cDNA ist, wurde zuerst cDNA aus Blut von zwei unbeimpften SCID-Mäusen untersucht. In einer der beiden Mäuse konnte eine minimale Aktinexpression nachgewiesen werden. Zur weiteren Analyse wurde anschließend aus zwei weiteren unbeimpften Mäusen Gewebe isoliert. Zum Einsatz kamen Lungen-, Leber-, Muskel- und Bindegewebe, um ein ungefähres Abbild möglichen Tumornachbargewebes wiederzugeben. Entgegen der Angaben der Universal Probe Library und entgegen einer Sequenzüberprüfung mittels ExPasy/Blast, konnte wiederum aus cDNA vereinzelter Mausproben durch eine LightCycler PCR Produkt für beta-Aktin amplifiziert werden. Eine human-spezifische Kontrolle des LPA1 und LPA3 Primerpaares (vorwärts b + rückwärts) ergab keine Amplifikation von cDNA aus murinem Blut oder murinen Lungen-, Leber-, Fett- und Muskelgewebe. Eine Spezifitätskontrolle des LPA2 Primerpaares (vorwärts b + rückwärts) mit Maus-cDNA, gewonnen aus Blut, Lungen-, Leber-, Fett- und Muskelgewebe erbrachte einen Nachweis einer Expression nur in einer von vier Fettgewebeproben.

## 4.4 Aktin

### 4.4.1 beta-Aktin Expression in Zelllinien

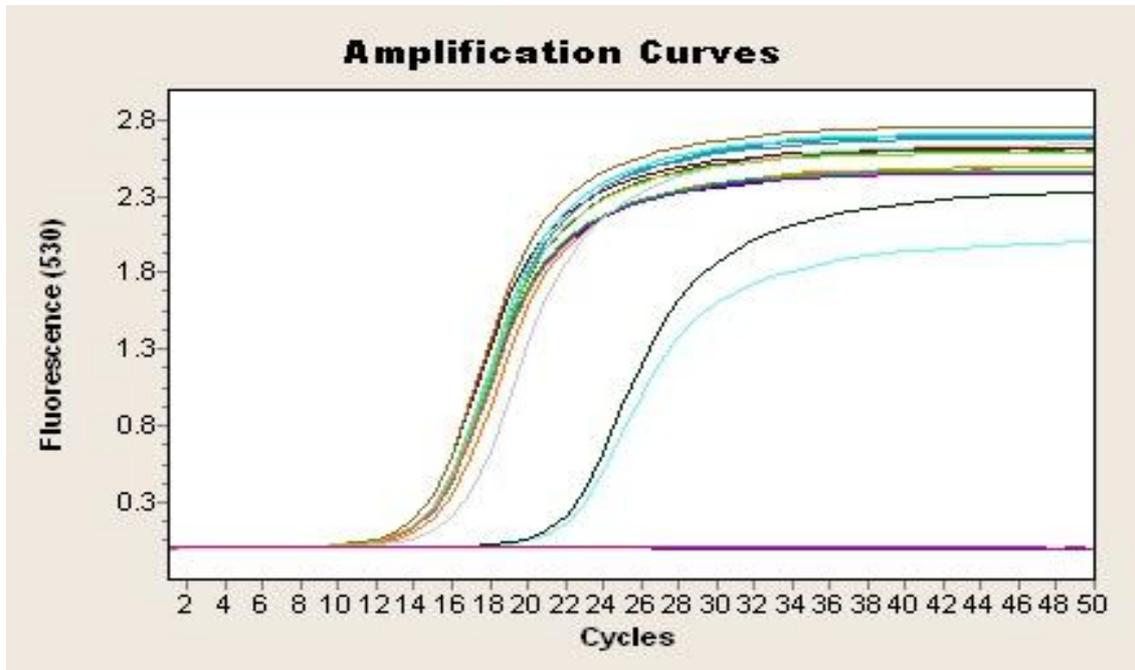


Abbildung 7: Darstellung der CP-Werte der Zelllinien einer beta-Aktin Messung im LightCycler. Die Zelllinien präsentieren sich homogen in einem engen CP-Wert Rahmen zwischen CP 13 und CP17. Im Mittel liegt ein CP-Wert von 15 vor. Der doppelt bestimmte Kalibrator hat einen CP-Wert von 23.

Es wurden jeweils drei Chargen einer Zelllinie gemessen. Da eine Messung im LightCycler Platz für 32 Proben bietet, wurden die in Kultur gewachsenen Zelllinien in zwei Gruppen eingeteilt. Eine umfasste die Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, die Zweite die Zelllinien des Mamma- und Kolon-Karzinoms und des malignen Melanoms. Auf die einzelnen Gruppen bezogen, zeigte sich ein gleich bleibender Expressionslevel des beta-Aktins. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte bei beiden Gruppen einen Peak bei  $T_m=85\text{ °C}$ , der der Schmelztemperatur der mitlaufenden Positivprobe entsprach und durch den Kalibrator bestätigt wurde. In der ersten Gruppe wurden die kleinzelligen Bronchialkarzinom Zelllinien gemessen. Der mittlere Cp-Wert lag bei  $C_p=25$ . Der Bereich erstreckte sich von  $C_p=22$  bis  $C_p=27$ . Der Cp-Wert des Kalibrators entsprach  $C_p=20$ . In der zweiten Gruppe wurden alle übrigen Zelllinien vermessen. Hier lag der Cp-Wert um einen Bereich von  $C_p= 15$ . Keiner der Werte unterschritt einen Wert von  $C_p=14$  oder überschritt einen Wert von  $C_p=19$ . Der Kalibrator Cp-Wert entsprach in dieser Gruppe einem Cp von  $C_p=23$ . Zwischen der Vermessung der ersten und der zweiten Gruppe lag ein Zeitraum von 36 Tagen.

#### 4.4.2 beta-Aktin Expression in Xenografttumoren

Um die Expression zwischen in vitro gezüchteten Zelllinien und in vivo in SCID-Mäusen xenotransplantierten Zelllinien vergleichen zu können, wurde aus in Paraffin eingebetteten Tumoren RNA gewonnen. Diese RNA wurde in cDNA umgeschrieben und im LightCycler System amplifiziert. Im Gegensatz zu den Zelllinien zeigten die Xenografttumore eine größere Heterogenität, bei einer Streuung von Cp=24 bis Cp=32. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte ein einheitliches Produkt bei Tm=85 °C.

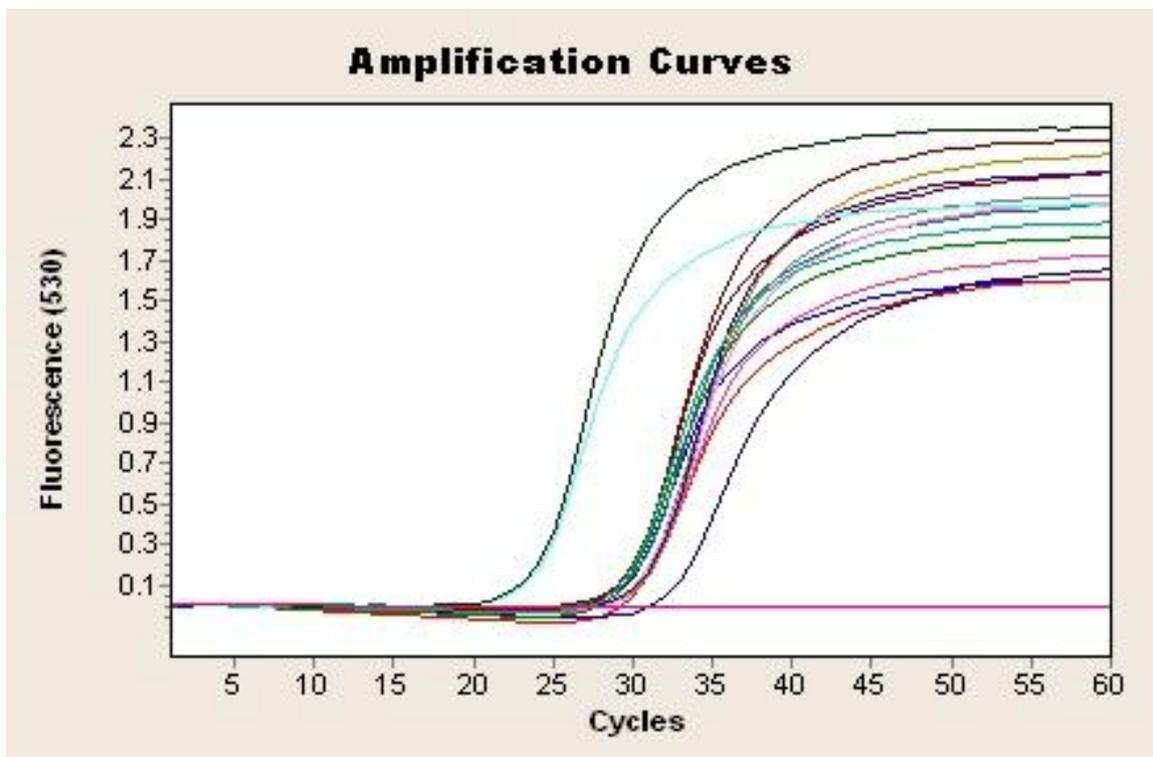


Abbildung 8: Darstellung einer Messung des beta-Aktins bei Xenografttumoren. Die CP-Werte der Xenografttumore weisen eine höhere Streuung als bei den Zelllinien auf. Auch liegen sie im Absolutwert höher. Der Kalibrator entspricht dem der Zelllinien (->Abbildung 7).

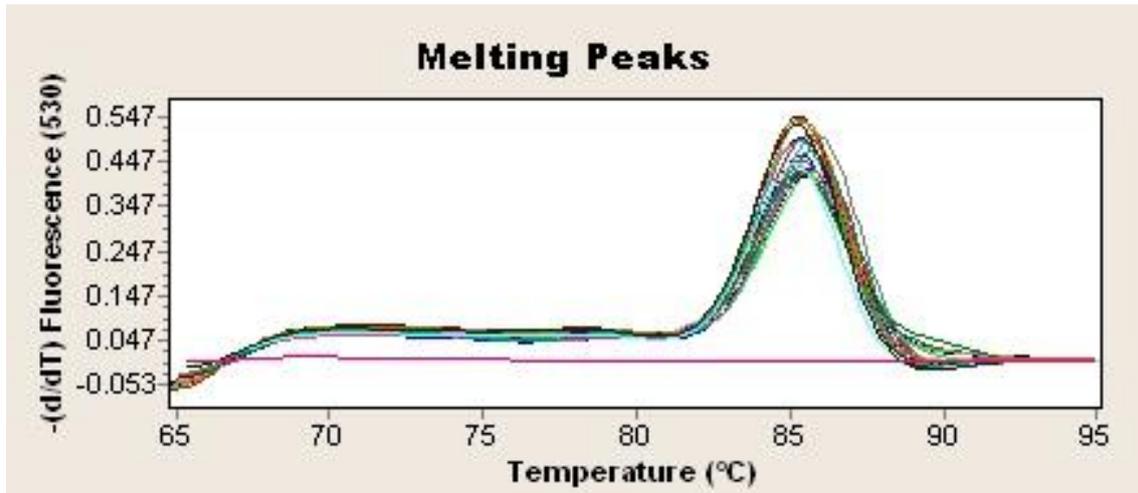


Abbildung 9: Darstellung der zugehörigen Schmelzpunkte zu Abbildung 8. Trotz der höheren Heterogenität der CP-Werte ergibt sich ein einheitliches Schmelzprodukt bei  $T_m=85\text{ }^\circ\text{C}$ . Eine der Negativprobe entsprechende Graphenlinie ohne Schmelzpunkt bestätigt die saubere Amplifikation.

#### 4.5 Expression der Lysophosphatidrezeptoren

Alle Zelllinien, sowohl die *in vitro* gezüchteten Kulturen, als auch die *in vivo* gezüchteten Xenografttumore, wurden auf die Expression der Lysophosphatidrezeptoren LPA1, LPA2 und LPA3 untersucht. Dabei wurden drei Chargen RNA der Kulturzellen und 5 Chargen RNA der Tumore mit jedem Primer als cDNA im LightCycler 2.0 System eingesetzt. In allen Zelllinien wurde die Expression eines oder mehrerer Rezeptoren gezeigt. Auch wurde ein direkter *in vivo/in vitro* Vergleich der Kulturzellen und Tumore durchgeführt.

#### 4.6 HUVEC

In der Kontrollzelllinie HUVEC zeigte sich eine hohe Expression von LPA1 und LPA2, hingegen konnte keine Expression von LPA3 Rezeptor mRNA gezeigt werden (siehe Abbildung 10).

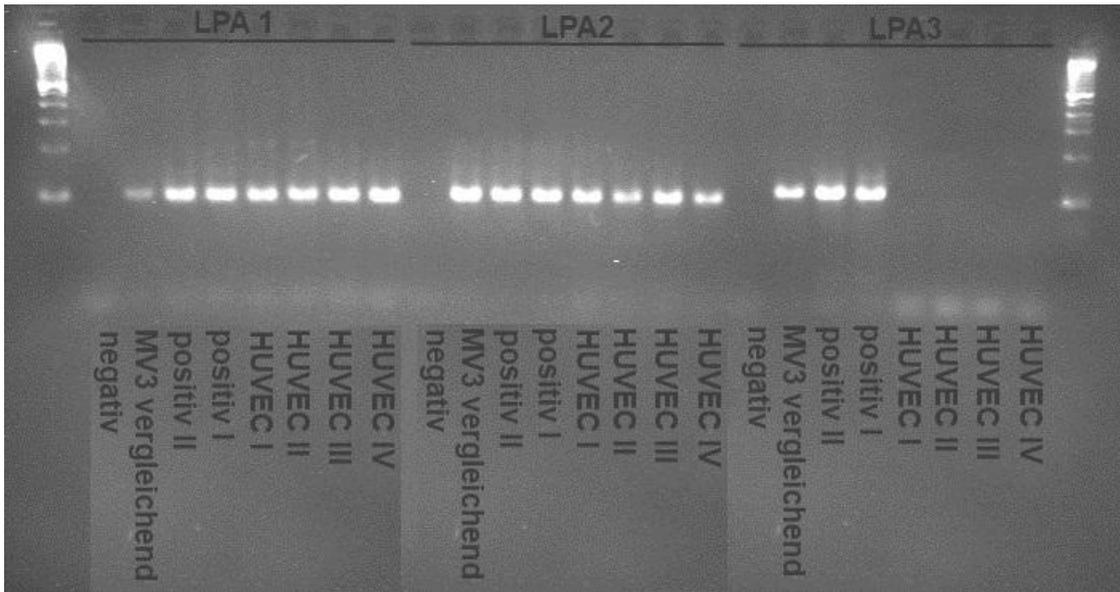


Abbildung 10: Expression von LPA1, LPA2 und LPA3 in gemessenen HUVEC-Zellen mit Positiv- und Negativproben zum Vergleich. Deutlich sichtbar ist die fehlende Bande zur LPA3 Expression, während LPA1 und LPA2 in allen HUVEC-Zellen exprimiert werden.

### LPA1 Zelllinien

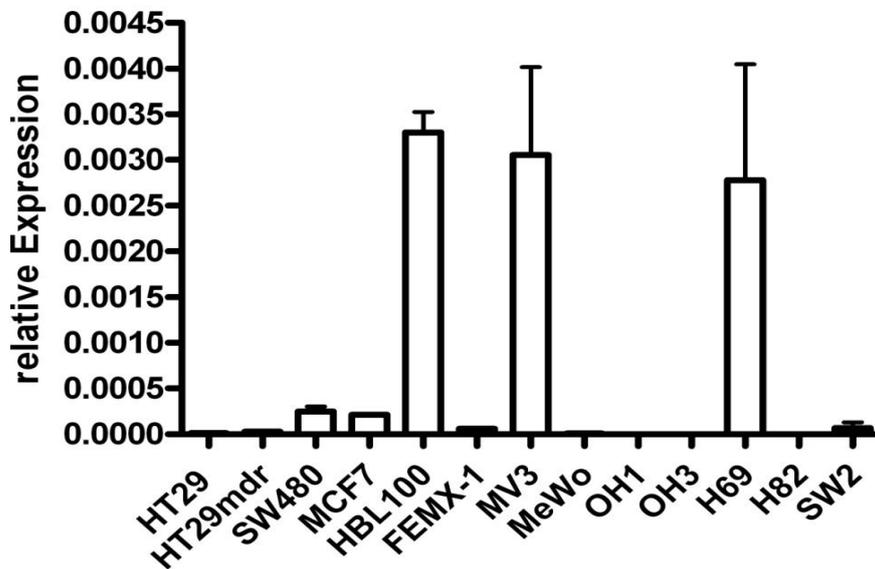


Abbildung 11: Darstellung der relativen LPA1 mRNA Expression in den gemessenen Kolon- und Mammakarzinomzellen, sowie den gemessenen Melanom- und Kleinzellerzellen. Dabei wird eine willkürliche, nicht vom Zelltyp abhängige, LPA1 Expression deutlich. Die vermehrte Expression von LPA1 in HBL100, MV3 und H69 sticht heraus.

## **4.7 LPA1**

### **4.7.1 Zelllinien**

Die Expression von LPA1 ließ sich nicht in allen untersuchten Zelllinien nachweisen (siehe Abbildung 11). Wenn ein Nachweis erfolgte, zeigte sich ein Produkt mit der Schmelztemperatur von  $T_m=85,5$  °C. Für die Zelllinien kolorektalen Ursprungs HT29, HT29mdr und SW480 ließ sich nur für SW480 eine deutliche Expression nachweisen. Die Expression der anderen beiden Zelllinien lag an der Nachweisgrenze. Für die Mammakarzinom Zelllinie MCF7 und die immortale Zelllinie mammaepithelialen Ursprungs HBL100 konnte eine Expression nachgewiesen werden. Relativ exprimierte HBL100 LPA1 im Mittel 12x höher als MCF7. Ein ähnliches Bild ergab sich bei den Melanoma-Zelllinien. MV3 bewegte sich auf einem Expressionslevel mit HBL100. Für FEMX-1 konnte eine sehr geringe Rezeptorexpression nachgewiesen werden, MeWo lag ähnlich den Kolonkarzinomzelllinien HT29 und HT29mdr an der Nachweisgrenze. Bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien konnte nur für H69 eine Rezeptorexpression definitiv nachgewiesen werden. Sie bewegte sich auf einem Level mit HBL100 und MV3. Für die Zelllinien OH3 und H82 wurde keine Expression nachgewiesen, für OH1 und SW2 ergab sich in drei Messungen ein positiver Wert.

### **4.7.2 Xenograftumore**

Bei der relativen Expression von LPA1 in Xenograftumoren zeigte sich ein heterogenes Bild (siehe Abbildung 12). Wenn eine Rezeptorexpression nachgewiesen wurde, lag sie, bis auf die Ausnahme der Zelllinie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms H69, um Faktor 10 bis Faktor 10.000 höher als die vergleichende Expression in der Zellkultur. Bei den Tumoren kolorektalen Ursprungs (HT29, HT29mdr und SW480) zeigte sich gegenüber den Zelllinien eine umgekehrte Darstellung der Rezeptorexpression. HT29 zeigte die höchste relative Expression, gefolgt von HT29mdr. Die relative Expression von HT29mdr entsprach 50 % der Expression von HT29. Für SW480 war keine Expression nachzuweisen. Auch für die Mammakarzinomzelllinie MCF7 und die immortale Zelle HBL100 mammaepithelialen Ursprungs konnte der Rezeptor nachgewiesen werden. Hier zeigte HBL100 die insgesamt höchste Expression. Gegenüber der Zellkultur wird im HBL100-Xenograft der Rezeptor 12x höher exprimiert. Für alle drei malignen Melanome konnte eine Expression von LPA1 gezeigt werden. Während MeWo relativ die geringste Expressionsrate zeigte, zeigte MV3, ähnlich wie in vitro, die höchste. FEMX-1 wies eine ähnlich hohe Expression wie MV3 auf, zeigte aber eine größere Schwankung der Expression innerhalb der einzelnen vermessenen Proben. Bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnte nur für den Tumor H69 eine Rezeptorexpression nachgewiesen werden. In den anderen kleinzelligen

Bronchialkarzinomen konnte LPA1 nicht nachgewiesen werden. Die relative Expression bewegte sich bei H69 auf gleichem Level wie bei der zugehörigen kultivierten Zelllinie.

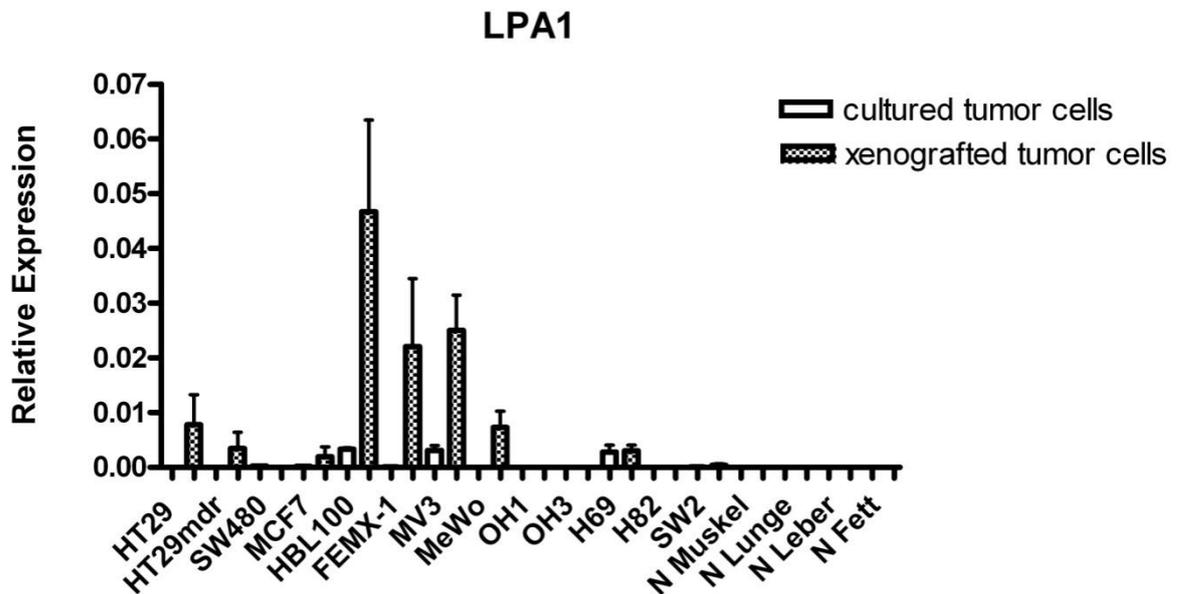


Abbildung 12: Darstellung der relativen LPA1 mRNA Expression der Xenografttumore, Zelllinien und mitvermessenen negativproben im Vergleich. Es fällt besonders die Hochregulation der LPA1 mRNA Expression für die Xenografttumore aus Melanomzelllinien und Kolonkarzinomzellen (bis auf SW480) auf.

## 4.8 LPA2

### 4.8.1 Zelllinien

Die Expression von LPA2 ließ sich für alle untersuchten Zelllinien nachweisen (siehe Abbildung 13). Es zeigte sich ein einheitliches Produkt bei einer Schmelztemperatur von  $T_m=88\text{ }^{\circ}\text{C}$ . In den Zelllinien konnte ein gravierender Unterschied der relativen Expression zwischen Kulturzellen aus kleinzelligem Bronchialkarzinom und den übrigen Entitäten festgestellt werden. Bei Zellen mit Ursprung aus kleinzelligem Bronchialkarzinom lag die relative Expression zwischen Faktor 5 und 20 mal höher gegenüber den anderen Kulturzellen. Alle anderen Zelllinien zeigten eine extrem geringe Expression.

#### **4.8.2 Xenograftumore**

Bei der LPA2 Expression in Xenograftumoren zeigte sich eine heterogene Expression (siehe Abbildung 14). LPA2 konnte bis auf zwei Entitäten in allen Tumoren nachgewiesen werden. Die relative Rezeptorexpression zwischen den Entitäten unterschied sich stark. Bei den aus Kolonkarzinomen gewonnenen Zellen konnten für HT29 und HT29mdr eine Rezeptorexpression nachgewiesen werden. SW480 wies keine LPA2-Expression auf. Des Weiteren lag die LPA2 Expression von HT29 doppelt so hoch wie bei HT29mdr. Beide Entitäten zeigten eine mindestens 15fach erhöhte Expression gegenüber den in vitro gezüchteten Zellen. Für das Mammakarzinom MCF7 konnte eine LPA2 Expression nachgewiesen werden. Diese lag 15fach höher als die Expression in Zellkultur. Für HBL100 konnte keine Rezeptorexpression im Xenograft gezeigt werden. Bei den Melanomen konnte für alle drei Tumore eine deutlich erhöhte Expression gegenüber in vitro gezüchteten Zellen gezeigt werden. Die Expression lag zwischen 25fach (FEMX-1) und 208fach (MV3) höher als in Zellkultur. MeWo zeigte eine 41fach höhere Expression als in Kultur. Auch für alle fünf kleinzelligen Bronchialkarzinome konnte eine Expression von LPA2 nachgewiesen werden. Auffallend war, dass sich die relative Expression entweder auf Höhe der relativen Expression in Zellkultur bewegte (OH3, H69 und SW2) oder eine deutlich geringere Expression zeigte (OH1 und H82).

### LPA2 Zelllinien

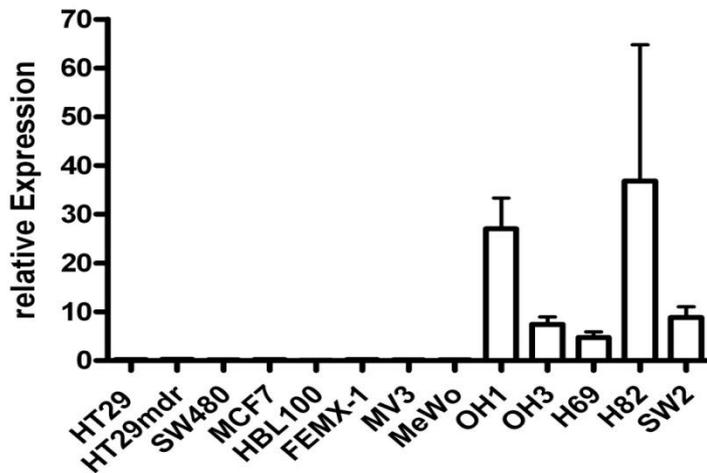


Abbildung 13: Darstellung der relativen LPA2 mRNA Expression in den gemessenen Kolon- und Mammakarzinomzellen, sowie in den gemessenen Melanom- und Kleinzellerzellen. Dabei zeigt sich eine konstante LPA2 Expression. In den gemessenen Kolonkarzinom-, Mammakarzinom und Melanomzellen zeigt sich eine schwache Expression von LPA2 mRNA, wohingegen die kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen eine im Vergleich sehr hohe LPA2 Expression zeigen.

### LPA2

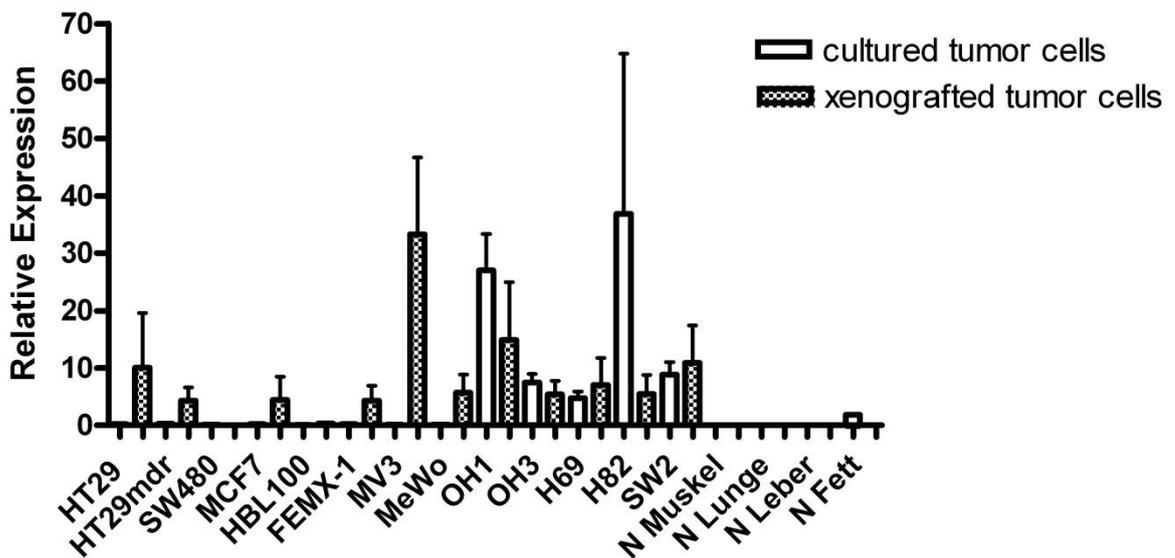


Abbildung 14: Darstellung der relativen LPA2 mRNA Expression der Xenografttumore, Zelllinien und mitvermessenen Negativproben im Vergleich. Alle Xenografttumore exprimieren LPA2. Vor allem alle xenograft Melanom- und kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen zeigen eine hohe, von der Expression in der korrespondierenden kultivierten Zelle unabhängige hohe, Expression von LPA2 mRNA.

## **4.9 LPA3**

### **4.9.1 Zelllinien**

Eine deutliche Expression von LPA3 ließ sich nur für vier der 13 untersuchten Zelllinien nachweisen (siehe Abbildung 15). Bei einem positiven Messergebnis zeigte sich ein einheitliches Produkt bei einer Schmelztemperatur von  $T_m=90$  °C. Der Nachweis einer Expression gelang nur in den Zelllinien von FEMX-1, MV3, H69 und H82. H82 stach durch eine 14-fach höhere Expression des Rezeptors gegenüber den vorher aufgezählten Zelllinien hervor. Alle anderen Zelllinien zeigten entweder keine oder eine Expression am Rande der Nachweisgrenze.

### **4.9.2 Xenograftumore**

Bei den Xenograftumoren zeigte sich ein ähnliches Expressionslevel wie für die in vitro gezüchteten Zellen. LPA3 konnte in insgesamt sechs der dreizehn Entitäten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Expressionsverhalten in vitro konnte für HT29 und HT29mdr eine Expression im Xenograftumor gezeigt werden. Hierbei lag die relative Expression in HT29 doppelt so hoch wie in HT29mdr. In SW480 konnte keine Expression von LPA3 nachgewiesen werden. Weder für das Mammakarzinom MCF7, noch für die immortale Zelle HBL100 konnte eine Rezeptorexpression gezeigt werden. Bis auf MeWo zeigten die Melanome eine deutlich gesteigerte Expression in vivo gegenüber in vitro. Sowohl bei FEMX-1, als auch bei MV3 lag der Expressionslevel höher, als bei den Messungen für die Zellkultur. FEMX-1 zeigte eine vierfach höhere Expression und MV3 eine dreifach höhere Expression gegenüber den Zellkulturen. Für MeWo konnte wie in vivo in vitro keine Rezeptorexpression gezeigt werden. Bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen zeigte sich in H82 eine Expression von LPA3. Der Expressionslevel war vergleichbar mit der Expression in Zellkultur. Im Gegensatz zum Nachweis von LPA3 in der Zellkultur von H69 gelang es nicht, eine Expression in vivo nachzuweisen. Dafür zeigte sich bei SW2 eine Rezeptorexpression. In OH1 und OH3 konnte in vivo wie in vitro keine Expression von LPA3 gefunden werden.

## LPA3 Zelllinien

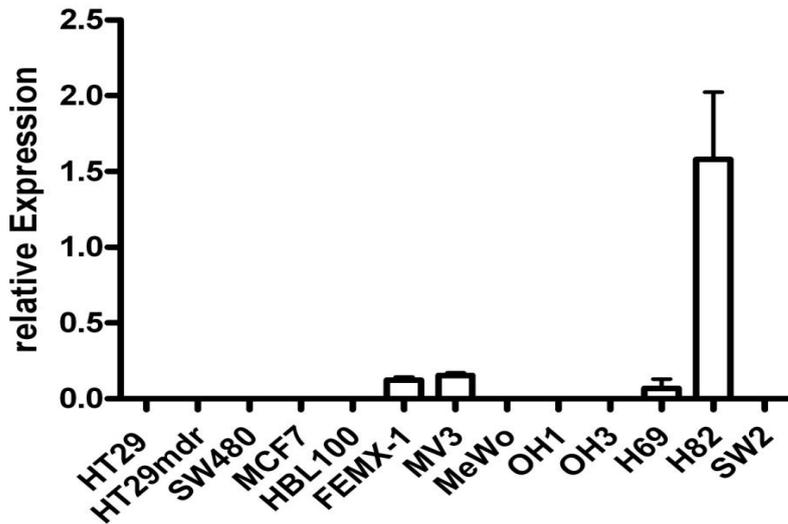


Abbildung 15: Darstellung der relativen LPA3 mRNA Expression in den gemessenen Kolon- und Mammakarzinomzellen, sowie den gemessenen Melanom- und Kleinzellerzellen. Dabei wird LPA3 mRNA nur von vier Zellen exprimiert, darunter zwei Melanom- und zwei kleinzellige Bronchialkarzinomzellen.

## LPA3

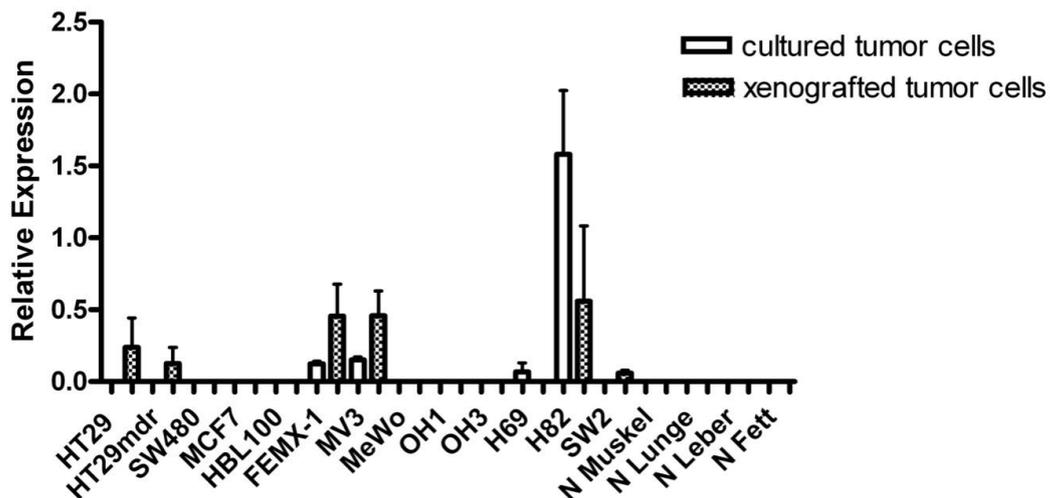


Abbildung 16: Darstellung der relativen LPA3 mRNA Expression der Xenograftumore, Zelllinien und mitvermessenen Negativproben im Vergleich. Jeweils zwei von drei Xenograft Kolonkarzinom- und Melanomzellen exprimieren dabei im Vergleich zur kultivierten Zelllinie vermehrt LPA3 mRNA.

## 5 Diskussion

Bis vor wenigen Jahren war die physiologische und pathophysiologische Rolle von LPA weitgehend unbeachtet geblieben. Erst vor Kurzem ist die Wichtigkeit dieses kleinen Lipidmoleküls in das Zentrum der Forschung gerückt (Sengupta et al., 2004, Liu et al., 2009a). Neben vielen wichtigen Rollen in der normalen Zellphysiologie (Meyer zu Heringdorf and Jakobs, 2007, Rivera and Chun, 2008) wurde für LPA auch in vielen Arbeiten eine zentrale Rolle für Tumorgenese und Metastasierung gezeigt (Ishii et al., 2004, Mills and Moolenaar, 2003, Liu et al., 2009a).

Die wichtige Rolle von LPA in der Entwicklung, dem Progress und der Metastasierung von malignen Erkrankungen wurde zuerst am Ovarialkarzinom erfasst (Fang et al., 2000), es folgte das Prostatakarzinom und wurde schließlich auf viele weitere Tumorentitäten ausgeweitet (Sengupta et al., 2004). Dabei wurde auch deutlich, dass in Abhängigkeit der Entität verschiedene LPA Rezeptoren für die Metastasierung eine Rolle spielen (Sengupta et al., 2004).

Die herausragende Beobachtung in den Versuchen ist die Veränderung der moderaten Rezeptorexpression der Zelllinien *in vitro* zu einer signifikant erhöhten Expression nach Xenotransplantation *in vivo*. Somit zeigt sich, dass eine Übertragbarkeit von *in vitro* gewonnenen Erkenntnissen an den hier gemessenen Zelllinien nicht ohne Weiteres auf ein *in vivo* Modell möglich ist. Grundsätzlich ist dabei davon auszugehen, dass das *in vivo* Modell mit xenotransplantierten SCID Mäusen wesentlich näher am tatsächlichen Zustand im Menschen liegt, als das *in vitro* Modell der Zellkultur. Fast alle Tumorentitäten exprimieren LPA1 und LPA2 *in vivo*. Die vermehrte Expression von LPA1 und LPA2 Rezeptoren wurde schon mit der Aggressivität einer Tumorerkrankung in Verbindung gebracht. Unter anderem wurden eine erhöhte Invasivität von metastasierenden Zelllinien und ein vermehrtes Tumorstadium festgestellt (Chen et al., 2007, Kitayama et al., 2004). Wohingegen für eine heruntergeregelte LPA1 Rezeptoraktivität eine verminderte Tumormotilität und Metastasierungsneigung gezeigt wurde (Horak et al., 2007b, Horak et al., 2007a, Lin et al., 2009). Vor allem die kombinierte Überexpression von LPA-Rezeptoren ist mit erhöhter Aggressivität verschiedener Malignitäten assoziiert (Chen et al., 2007, Yamada et al., 2008, Yu et al., 2008). Diese bisherigen Erkenntnisse decken sich mit den im Versuch gezeigten Ergebnissen, welche eine gleichzeitige Hochregulation von LPA1 und LPA2 mRNA, in manchen Fällen sogar mit kombinierter LPA3 mRNA Expressionssteigerung nach Xenotransplantation zeigen. Auch wird die Rolle von LPA in der Metastasierung dadurch unterstrichen, dass die Kolonkarzinomzelllinie SW480, welche in SCID Mäusen nicht metastasiert (Schumacher and Adam, 1997), keine LPA-Rezeptoren *in vivo* exprimiert. Ferner unterstützt diese These, das HBL100, eine durch Integration von SV40 Genom veränderte mammaepitheliale Zelllinie, bei nicht vorhandener Metastasierung in SCID

Mäusen (Schumacher and Adam, 1997), nur LPA1 nach Xenotransplantation hochreguliert.

### **5.1 Kolonkarzinomzelllinien**

Für die gemessenen Kolonkarzinomzelllinien konnten mit Ausnahme der Zelllinie SW480 eine hohe Expression aller drei LPA Rezeptoren gezeigt werden. Die bisherigen Erkenntnisse für Malignitäten gastrointestinalen Ursprunges zeigen eine proliferationssteigernde Wirkung, eine Migrations- und Invasionsneigung, stimuliert über LPA1 und LPA2 (Yun et al., 2005, Shida et al., 2003, Rusovici et al., 2007). Für die Zelllinie SW480 konnte gezeigt werden, dass sie als Xenotransplantat keine Metastasierungsneigung hat (Schumacher and Adam, 1997). Als Bestätigung zeigt die Zelllinie in den Versuchen, im Gegensatz zu den metastasierenden Zelllinien, keine Expression von LPA-Rezeptoren. Hier wäre es interessant weiterzuverfolgen, ob unter LPA Serumzugabe die Zellkultur ein ähnliches LPA-Rezeptorexpressionsverhalten zeigt. Auch das Ausknocken einzelner LPA-Rezeptoren und dadurch Erfassung des Einflusses auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten ist hier als wichtig einzuschätzen. Für das Ausschalten von LPA2 konnte schon eine Verminderung der Tumorbildung in einem speziellen Colitis Ulcerosa Modell gezeigt werden (Lin et al., 2009).

### **5.2 Mammakarzinomzelllinien**

Dass die LPA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Genese, Proliferation und Metastasierung des Mammakarzinoms spielen, wurde in den letzten Jahren mehrfach gezeigt (Panupinthu et al., 2010, Liu et al., 2009b, Jonkers and Moolenaar, 2009). Bei den gemessenen Mammakarzinomzelllinien kann man HBL100 zwar als genetisch veränderte Zelle (es sind Teile des SV40 Genoms integriert) einstufen, allerdings fehlt dieser Zelllinie die Metastasierungstendenz (Schumacher and Adam, 1997). Das spiegelt sich auch in den gemessenen LPA-Rezeptorexpressionen wieder, HBL100 fehlt *in vivo* eine LPA2 Rezeptorexpression. Allgemein wurde eine wichtige Rolle von LPA1 für Proliferation und Metastasierung (Boucharaba et al., 2006) bei Mammakarzinomen gezeigt. Für die gemessene Zelllinie MCF7 konnten als wichtige Zuspäher für eine ossäre Metastasierung LPA1 und LPA2 identifiziert werden (Boucharaba et al., 2004), welche sich in den hier durchgeführten Versuchen als relative Mehrexpression von diesen beiden Rezeptoren gut widerspiegelt. Im Vergleich von MCF7 und HBL100 könnte man die Relevanz der einzelnen LPA-Rezeptoren *in vivo* weiterverfolgen. Vor allem interessant zu klären ist der Punkt, ob LPA2 alleine oder nur im Zusammenspiel eine Metastasierung in MCF7 gegenüber HBL100 begünstigt.

### 5.3 Melanomzelllinien

Über das Zusammenspiel von LPA mit Initiation, Proliferation und Metastasierung bei Melanomen ist bisher wenig bekannt. Allerdings scheint auch hier nach ersten Erkenntnissen die neu postulierte ATX-LPA Rezeptorachse eine entscheidende Rolle zu spielen (Liu et al., 2009a, Saunders et al., 2008). Wenn man die bisherigen Erkenntnisse vom Mammakarzinom und gastrointestinalen Tumoren auf Melanome interpoliert, so ergibt sich auch hier eine wichtige Rolle von LPA1 und LPA2 in Proliferation und Metastasierung. Dieses zeigt sich auch an der erhöhten Expressionsrate dieser Rezeptoren im Xenotransplantat *in vivo* gegenüber dem *in vitro* Zellversuch. Weitere Erkenntnisse sind hier besonders bezüglich des Metastasierungsverhaltens wichtig. Auch könnte ein Ausknocken einzelner LPA-Rezeptoren im *in vivo* Modell darüber Aufschluss gewähren.

### 5.4 Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Der *in vitro* Versuch dieser Zelllinien unterscheidet sich von den anderen durch das Fehlen einer Adhäsion dieser Zellen. Dies spiegelt sich in der schon *in vitro* deutlich erhöhten LPA2 Expression wieder. LPA2 spielt generell eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen (Zheng et al., 2001, Zheng et al., 2000, Panchatcharam et al., 2008), sodass nicht adhäsive Zellen in Kultur auf eine erhöhte LPA2 Rezeptorexpression angewiesen sind. *In vivo* verändert sich das Expressionsmuster der Kleinzeller weniger, als das der anderen Zelllinien. Die hohe Expression von LPA2 bleibt erhalten und sehr unterschiedlich wird die Expression der anderen Rezeptoren gehandhabt. Erst kürzlich konnte aber auch für Bronchialkarzinome eine wichtige Rolle von LPA beim Tumorwachstum und der zugehörigen Angiogenese gezeigt werden (Xu and Prestwich, 2010). In Kombination mit den „in vitro“ Ergebnissen kann aber auch hier eine wichtige Rolle von LPA2 bei der Zellmotilität vermutet werden.

### 5.5 Referenzgen beta-Aktin

Um eine relative Vergleichbarkeit der Genexpression herstellen zu können, wurde beta-Aktin als Referenzgen oder housekeeping-Gen verwendet. Referenzgene zeichnen sich dadurch aus, dass sie in allen Zellen ubiquitär und homogen exprimiert werden. Aktin ist ein essenzieller Bestandteil des Zytoskeletts von Zellen, welches für jede Zelle überlebenswichtig ist. Andere übliche Referenzgene sind die ribosomalen Untereinheiten 18S und 28S, sowie Ubiquitin. Das Referenzgen dient bei der relativen Quantifizierung der RTQ-PCR Produkte zum Fehlerausgleich. Es wird davon ausgegangen, dass sich alle Fehlerquellen, die von Untersuchungscharge zu Untersuchungscharge auftreten (Gewebequalität, RNA-Degeneration, cDNA-

Degeneration, Effizienz der Primer, der reversen Transkriptase, Pipettierfehler, etc.), sowohl auf das Referenzgen, als auch auf das Zielgen niederschlagen. Durch das Miterfassen des Referenzgens normalisiert man den Versuchsablauf und erhält bei den durchgeführten Untersuchungen das Verhältnis zwischen Referenz- und Zielgen. Gleichzeitig erhält man durch das Referenzgen eine Positivkontrolle, da Aktin als Referenzgen ein hohes Expressionslevel aufweist.

## 6 Zusammenfassung

Die Metastasierung von malignen Tumoren führt bei vielen Patienten zu einem Therapieversagen, von daher ist eine intensive Erforschung der Metastasierungsmechanismen schon lange Fokus der Wissenschaft. LPA-Rezeptoren wurden hier als Schlüsselement identifiziert. In dieser vergleichenden Untersuchung von humanen, metastasierenden und nicht-metastasierenden Tumorzellen soll die Rolle von den Rezeptoren LPA1-3 für die Metastasierung gezeigt werden. Gleichzeitig wird eine Übertragbarkeit von Ergebnissen aus der Zellkultur auf den Tierversuch überprüft. Dafür wurden dreizehn verschiedene in SCID-Mäusen herangezüchtete Tumorzellen mit einer humanen Nabelschnurendothelzelle auf die relative Rezeptorexpression von LPA1-3 untersucht und mit der relativen Rezeptorexpression der Zellen in Zellkultur verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die LPA-Rezeptorexpression von Tumorzelle zu Tumorzelle deutlich unterscheidet und es kein festes Tumorexpressionsmuster für LPA-Rezeptoren gibt. Auch ist eine Übertragbarkeit zwischen Zellkultur und Xenograftversuch nur bedingt möglich. Jedoch stimmen bisher gezeigte Funktionen von LPA-Rezeptoren mit dem Verteilungsmuster im Xenograft überein. Zusammenfassend unterstreichen die durchgeführten Versuche die Signifikanz von LPA in der Pathophysiologie von Tumoren. Sie zeigen aber auch, dass Erkenntnisse die im Zellkulturversuch gewonnen wurden nicht ohne weiteres auf das Tiermodell oder weitergedacht auf den Menschen übertragen werden können. Den Fakt der Übertragbarkeit kann man optimal anhand der Kolonkarzinomzelllinie HT29 aufzeigen. „In vitro“ exprimiert die Zelle die Rezeptoren LPA1 und LPA2 am Rande der Nachweisgrenze, während diese Rezeptorexpression im „in vivo“ Xenotransplantat gravierend ansteigt. Das eine Erhöhung der LPA Rezeptoren im Zusammenspiel mit der Aktivierung von Her2, EGFR und anderen Signalkaskaden eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von gastrointestinalen Tumoren spielt ist bekannt. LPA-Rezeptoren spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Metastasierung. Allerdings scheint mehr das Zusammenspiel der bisher bekannten und eventuell noch unbekanntem LPA-Rezeptoren die entscheidende Rolle zu spielen. Der spezielle LPA-Rezeptor für Metastasierung existiert nicht. Für die weitere Erforschung des Zusammenspiels der LPA-Rezeptoren bietet das Tiermodell wesentlich besser auf den Menschen übertragbare Ergebnisse als Versuche in der Zellkultur.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

- ANLIKER, B. & CHUN, J. 2004. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 279, 20555-8.
- BALAZS, L., OKOLICANY, J., FERREBEE, M. & TIGYI, G. 2000. Topical application of LPA accelerates wound healing. *Ann N Y Acad Sci*, 905, 270-3.
- BALAZS, L., OKOLICANY, J., FERREBEE, M., TOLLEY, B. & TIGYI, G. 2001. Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280, R466-72.
- BOUCHARABA, A., SERRE, C. M., GRES, S., SAULNIER-BLACHE, J. S., BORDET, J. C., GUGLIELMI, J., CLEZARDIN, P. & PEYRUCHAUD, O. 2004. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest*, 114, 1714-25.
- BOUCHARABA, A., SERRE, C. M., GUGLIELMI, J., BORDET, J. C., CLEZARDIN, P. & PEYRUCHAUD, O. 2006. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9643-8.
- CAMPBELL, D. S. & HOLT, C. E. 2001. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*, 32, 1013-26.
- CHEN, M., TOWERS, L. N. & O'CONNOR, K. L. 2007. LPA2 (EDG4) mediates Rho-dependent chemotaxis with lower efficacy than LPA1 (EDG2) in breast carcinoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C1927-33.
- CHOI, J. W., HERR, D. R., NOGUCHI, K., YUNG, Y. C., LEE, C. W., MUTOH, T., LIN, M. E., TEO, S. T., PARK, K. E., MOSLEY, A. N. & CHUN, J. 2010. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 157-86.
- CHUN, J., GOETZL, E. J., HLA, T., IGARASHI, Y., LYNCH, K. R., MOOLENAAR, W., PYNE, S. & TIGYI, G. 2002. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, 54, 265-9.
- CHUN, J., HLA, T., LYNCH, K. R., SPIEGEL, S. & MOOLENAAR, W. H. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, 62, 579-87.
- CONTOS, J. J., ISHII, I. & CHUN, J. 2000. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*, 58, 1188-96.

- DUBIN, A. E., BAHNSON, T., WEINER, J. A., FUKUSHIMA, N. & CHUN, J. 1999. Lysophosphatidic acid stimulates neurotransmitter-like conductance changes that precede GABA and L-glutamate in early, presumptive cortical neuroblasts. *J Neurosci*, 19, 1371-81.
- EICHHOLTZ, T., JALINK, K., FAHRENFORT, I. & MOOLENAAR, W. 1993a. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J*.
- EICHHOLTZ, T., JALINK, K., FAHRENFORT, I. & MOOLENAAR, W. H. 1993b. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J*, 291 ( Pt 3), 677-80.
- FANG, X., GAUDETTE, D., FURUI, T., MAO, M., ESTRELLA, V., EDER, A., PUSTILNIK, T., SASAGAWA, T., LAPUSHIN, R., YU, S., JAFFE, R. B., WIENER, J. R., ERICKSON, J. R. & MILLS, G. B. 2000. Lysophospholipid growth factors in the initiation, progression, metastases, and management of ovarian cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 905, 188-208.
- FANG, X., SCHUMMER, M., MAO, M., YU, S., TABASSAM, F. H., SWABY, R., HASEGAWA, Y., TANYI, J. L., LAPUSHIN, R., EDER, A., JAFFE, R., ERICKSON, J. & MILLS, G. B. 2002. Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 257-64.
- FERRY, G., TELLIER, E., TRY, A., GRES, S., NAIME, I., SIMON, M. F., RODRIGUEZ, M., BOUCHER, J., TACK, I., GESTA, S., CHOMARAT, P., DIEU, M., RAES, M., GALIZZI, J. P., VALET, P., BOUTIN, J. A. & SAULNIER-BLACHE, J. S. 2003. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem*, 278, 18162-9.
- FOURCADE, O., SIMON, M. F., VIODE, C., RUGANI, N., LEBALLE, F., RAGAB, A., FOURNIE, B., SARDA, L. & CHAP, H. 1995. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*, 80, 919-27.
- FUKUSHIMA, N., WEINER, J. A. & CHUN, J. 2000. Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Dev Biol*, 228, 6-18.
- GOETZL, E. J., DOLEZALOVA, H., KONG, Y., HU, Y. L., JAFFE, R. B., KALLI, K. R. & CONOVER, C. A. 1999. Distinctive expression and functions of the type 4 endothelial differentiation gene-encoded G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid in ovarian cancer. *Cancer Res*, 59, 5370-5.

- GOETZL, E. J., LEE, H., AZUMA, T., STOSSEL, T. P., TURCK, C. W. & KARLINER, J. S. 2000. Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 275, 14573-8.
- HAMA, K., BANDO, K., KAKEHI, Y., AOKI, J. & ARAI, H. 2002. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett*, 523, 187-92.
- HAO, F., TAN, M., XU, X., HAN, J., MILLER, D. D., TIGYI, G. & CUI, M. Z. 2007. Lysophosphatidic acid induces prostate cancer PC3 cell migration via activation of LPA(1), p42 and p38alpha. *Biochim Biophys Acta*, 1771, 883-92.
- HASERUCK, N., ERL, W., PANDEY, D., TIGYI, G., OHLMANN, P., RAVANAT, C., GACHET, C. & SIESS, W. 2004. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood*, 103, 2585-92.
- HAYASHI, K., TAKAHASHI, M., NISHIDA, W., YOSHIDA, K., OHKAWA, Y., KITABATAKE, A., AOKI, J., ARAI, H. & SOBUE, K. 2001. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res*, 89, 251-8.
- HECHT, J. H., WEINER, J. A., POST, S. R. & 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, 1071-83.
- HIRAMATSU, T., SONODA, H., TAKANEZAWA, Y., MORIKAWA, R., ISHIDA, M., KASAHARA, K., SANAI, Y., TAGUCHI, R., AOKI, J. & ARAI, H. 2003. Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta. *J Biol Chem*, 278, 49438-47.
- HOPE, J. M., WANG, F. Q., WHYTE, J. S., ARIZTIA, E. V., ABDALLA, W., LONG, K. & FISHMAN, D. A. 2009. LPA receptor 2 mediates LPA-induced endometrial cancer invasion. *Gynecol Oncol*, 112, 215-23.
- HORAK, C. E., LEE, J. H., ELKAHLOUN, A. G., BOISSAN, M., DUMONT, S., MAGA, T. K., ARNAUD-DABERNAT, S., PALMIERI, D., STETLER-STEVENSON, W. G., LACOMBE, M. L., MELTZER, P. S. & STEEG, P. S. 2007a. Nm23-H1 suppresses tumor cell motility by down-regulating the lysophosphatidic acid receptor EDG2. *Cancer Res*, 67, 7238-46.
- HORAK, C. E., MENDOZA, A., VEGA-VALLE, E., ALBAUGH, M., GRAFF-CHERRY, C., MCDERMOTT, W. G., HUA, E., MERINO, M. J., STEINBERG, S. M., KHANNA, C. & STEEG, P. S. 2007b. Nm23-H1 suppresses metastasis

- by inhibiting expression of the lysophosphatidic acid receptor EDG2. *Cancer Res*, 67, 11751-9.
- Houben, A. J. & Mooleenaar, W. H. 2011. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev*.
- Hu, Y. L., Tee, M. K., Goetzl, E. J., Auersperg, N., Mills, G. B., Ferrara, N. & Jaffe, R. B. 2001. Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 93, 762-8.
- Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X. & Chun, J. 2004. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem*, 73, 321-54.
- Jalink, K., Mooleenaar, W. H. & Van Duijn, B. 1993. Lysophosphatidic acid is a chemoattractant for *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1857-61.
- Jalink, K., Van Corven, E. J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. & Mooleenaar, W. H. 1994. Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol*, 126, 801-10.
- Jonkers, J. & Mooleenaar, W. H. 2009. Mammary tumorigenesis through LPA receptor signaling. *Cancer Cell*, 15, 457-9.
- Kishi, Y., Okudaira, S., Tanaka, M., Hama, K., Shida, D., Kitayama, J., Yamori, T., Aoki, J., Fujimaki, T. & Arai, H. 2006. Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 281, 17492-500.
- Kitayama, J., Shida, D., Sako, A., Ishikawa, M., Hama, K., Aoki, J., Arai, H. & Nagawa, H. 2004. Over-expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res*, 6, R640-6.
- Kotarsky, K., Boketoft, A., Bristulf, J., Nilsson, N. E., Norberg, A., Hansson, S., OWMAN, C., Sillard, R., Leeb-Lundberg, L. M. & Olde, B. 2006. Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 619-28.
- Lee, C. W., Rivera, R., Dubin, A. E. & Chun, J. 2007a. LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *J Biol Chem*, 282, 4310-7.

- LEE, C. W., RIVERA, R., GARDELL, S., DUBIN, A. E. & CHUN, J. 2006. GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem*, 281, 23589-97.
- LEE, S., JEONG, J., MAJEWSKI, T., SCHERER, S. E., KIM, M. S., TUZIAK, T., TANG, K. S., BAGGERLY, K., GROSSMAN, H. B., ZHOU, J. H., SHEN, L., BONDARUK, J., AHMED, S. S., SAMANTA, S., SPIESS, P., WU, X., FILIPEK, S., MCCONKEY, D., BAR-ELI, M., ISSA, J. P., BENEDICT, W. F. & CZERNIAK, B. 2007b. Forerunner genes contiguous to RB1 contribute to the development of in situ neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 13732-7.
- LIN, S., LEE, S. J., SHIM, H., CHUN, J. & YUN, C. C. 2010. The absence of LPA receptor 2 reduces the tumorigenesis by ApcMin mutation in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299, G1128-38.
- LIN, S., WANG, D., IYER, S., GHALEB, A. M., SHIM, H., YANG, V. W., CHUN, J. & YUN, C. C. 2009. The absence of LPA2 attenuates tumor formation in an experimental model of colitis-associated cancer. *Gastroenterology*, 136, 1711-20.
- LIU, S., MURPH, M., PANUPINTHU, N. & MILLS, G. B. 2009a. ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer. *Cell Cycle*, 8, 3695-701.
- LIU, S., UMEZU-GOTO, M., MURPH, M., LU, Y., LIU, W., ZHANG, F., YU, S., STEPHENS, L. C., CUI, X., MURROW, G., COOMBES, K., MULLER, W., HUNG, M. C., PEROU, C. M., LEE, A. V., FANG, X. & MILLS, G. B. 2009b. Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell*, 15, 539-50.
- MAJEWSKI, T., LEE, S., JEONG, J., YOON, D. S., KRAM, A., KIM, M. S., TUZIAK, T., BONDARUK, J., PARK, W. S., TANG, K. S., CHUNG, W., SHEN, L., AHMED, S. S., JOHNSTON, D. A., GROSSMAN, H. B., DINNEY, C. P., ZHOU, J. H., HARRIS, R. A., SNYDER, C., FILIPEK, S., NAROD, S. A., WATSON, P., LYNCH, H. T., GAZDAR, A., BAR-ELI, M., WU, X. F., MCCONKEY, D. J., BAGGERLY, K., ISSA, J. P., BENEDICT, W. F., SCHERER, S. E. & CZERNIAK, B. 2008. Understanding the development of human bladder cancer by using a whole-organ genomic mapping strategy. *Lab Invest*, 88, 694-721.
- MEYER ZU HERINGDORF, D. & JAKOBS, K. H. 2007. Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 923-40.
- MILLS, G. B., EDER, A., FANG, X., HASEGAWA, Y., MAO, M., LU, Y., TANYI, J., TABASSAM, F. H., WIENER, J., LAPUSHIN, R., YU, S., PARROTT, J. A., COMPTON, T., TRIBLEY, W., FISHMAN, D., STACK, M. S., GAUDETTE, D., JAFFE, R., FURUI, T., AOKI, J. & ERICKSON, J. R. 2002. Critical role of

- lysophospholipids in the pathophysiology, diagnosis, and management of ovarian cancer. *Cancer Treat Res*, 107, 259-83.
- MILLS, G. B. & MOOLENAAR, W. H. 2003. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, 582-91.
- MOOLENAAR, W. H. 1994. LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends Cell Biol*, 4, 213-9.
- MOOLENAAR, W. H. 1995. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem*, 270, 12949-52.
- MOOLENAAR, W. H. 1999. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res*, 253, 230-8.
- MOOLENAAR, W. H., KRANENBURG, O., POSTMA, F. R. & ZONDAG, G. C. 1997. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 168-73.
- MOOLENAAR, W. H., VAN MEETEREN, L. A. & GIEPMANS, B. N. 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*, 26, 870-81.
- MURPH, M. M., HURST-KENNEDY, J., NEWTON, V., BRINDLEY, D. N. & RADHAKRISHNA, H. 2007. Lysophosphatidic acid decreases the nuclear localization and cellular abundance of the p53 tumor suppressor in A549 lung carcinoma cells. *Mol Cancer Res*, 5, 1201-11.
- MURPH, M. M., SCACCIA, L. A., VOLPICELLI, L. A. & RADHAKRISHNA, H. 2003. Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway. *J Cell Sci*, 116, 1969-80.
- NEIDLINGER, N. A., LARKIN, S. K., BHAGAT, A., VICTORINO, G. P. & KUYPERS, F. A. 2006. Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. *J Biol Chem*, 281, 775-81.
- NOGUCHI, K., ISHII, S. & SHIMIZU, T. 2003. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem*, 278, 25600-6.
- PANCHATCHARAM, M., MIRIYALA, S., YANG, F., ROJAS, M., END, C., VALLANT, C., DONG, A., LYNCH, K., CHUN, J., MORRIS, A. J. & SMYTH, S. S. 2008. Lysophosphatidic acid receptors 1 and 2 play roles in regulation of vascular injury responses but not blood pressure. *Circ Res*, 103, 662-70.

- PANUPINTHU, N., LEE, H. Y. & MILLS, G. B. 2010. Lysophosphatidic acid production and action: critical new players in breast cancer initiation and progression. *Br J Cancer*, 102, 941-6.
- POSTMA, F. R., JALINK, K., HENGEVELD, T., BOT, A. G., ALBLAS, J., DE JONGE, H. R. & MOOLENAAR, W. H. 1996. Serum-induced membrane depolarization in quiescent fibroblasts: activation of a chloride conductance through the G protein-coupled LPA receptor. *EMBO J*, 15, 63-72.
- POSTMA, F. R., JALINK, K., HENGEVELD, T., OFFERMANN, S. & MOOLENAAR, W. H. 2001. Galpho13 mediates activation of a depolarizing chloride current that accompanies RhoA activation in both neuronal and nonneuronal cells. *Curr Biol*, 11, 121-4.
- RAMAKERS, G. J. & MOOLENAAR, W. H. 1998. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res*, 245, 252-62.
- RIVERA, R. & CHUN, J. 2008. Biological effects of lysophospholipids. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 160, 25-46.
- RUSOVICI, R., GHALEB, A., SHIM, H., YANG, V. W. & YUN, C. C. 2007. Lysophosphatidic acid prevents apoptosis of Caco-2 colon cancer cells via activation of mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of Bad. *Biochim Biophys Acta*, 1770, 1194-203.
- SANO, T., BAKER, D., VIRAG, T., WADA, A., YATOMI, Y., KOBAYASHI, T., IGARASHI, Y. & TIGYI, G. 2002. Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem*, 277, 21197-206.
- SAUNDERS, L. P., OUELLETTE, A., BANDLE, R., CHANG, W. C., ZHOU, H., MISRA, R. N., DE LA CRUZ, E. M. & BRADDOCK, D. T. 2008. Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion. *Mol Cancer Ther*, 7, 3352-62.
- SCHULZE, C., SMALES, C., RUBIN, L. L. & STADDON, J. M. 1997. Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *J Neurochem*, 68, 991-1000.
- SCHUMACHER, U. & ADAM, E. 1997. Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J*, 29, 677-84.
- SENGUPTA, S., WANG, Z., TIPPS, R. & XU, Y. 2004. Biology of LPA in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*, 15, 503-12.

- SENGUPTA, S., XIAO, Y. J. & XU, Y. 2003. A novel laminin-induced LPA autocrine loop in the migration of ovarian cancer cells. *FASEB J*, 17, 1570-2.
- SHEN, Z., BELINSON, J., MORTON, R. E. & XU, Y. 1998. Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulates lysophosphatidic acid secretion from ovarian and cervical cancer cells but not from breast or leukemia cells. *Gynecol Oncol*, 71, 364-8.
- SHIDA, D., FANG, X., KORDULA, T., TAKABE, K., LEPINE, S., ALVAREZ, S. E., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. 2008. Cross-talk between LPA1 and epidermal growth factor receptors mediates up-regulation of sphingosine kinase 1 to promote gastric cancer cell motility and invasion. *Cancer Res*, 68, 6569-77.
- SHIDA, D., KITAYAMA, J., YAMAGUCHI, H., OKAJI, Y., TSUNO, N. H., WATANABE, T., TAKUWA, Y. & NAGAWA, H. 2003. Lysophosphatidic acid (LPA) enhances the metastatic potential of human colon carcinoma DLD1 cells through LPA1. *Cancer Res*, 63, 1706-11.
- SHIDA, D., KITAYAMA, J., YAMAGUCHI, H., YAMASHITA, H., MORI, K., WATANABE, T. & NAGAWA, H. 2005. Lysophospholipids transactivate HER2/neu (erbB-2) in human gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 327, 907-14.
- STURM, A. & DIGNASS, A. U. 2002. Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 282-8.
- SUGIURA, T., NAKANE, S., KISHIMOTO, S., WAKU, K., YOSHIOKA, Y. & TOKUMURA, A. 2002. Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *J Lipid Res*, 43, 2049-55.
- TIGYI, G. & MILEDI, R. 1992. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, 267, 21360-7.
- TOKUMURA, A., MAJIMA, E., KARIYA, Y., TOMINAGA, K., KOGURE, K., YASUDA, K. & FUKUZAWA, K. 2002. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 277, 39436-42.
- UMEZU-GOTO, M., KISHI, Y., TAIRA, A., HAMA, K., DOHMAE, N., TAKIO, K., YAMORI, T., MILLS, G. B., INOUE, K., AOKI, J. & ARAI, H. 2002. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*, 158, 227-33.
- VAN CORVEN, E. J., GROENINK, A., JALINK, K., EICHHOLTZ, T. & MOOLENAAR, W. H. 1989. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*, 59, 45-54.

- VAN DER BEND, R. L., BRUNNER, J., JALINK, K., VAN CORVEN, E. J., MOOLENAAR, W. H. & VAN BLITTERSWIJK, W. J. 1992. Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO J*, 11, 2495-501.
- VAN LEEUWEN, F. N., OLIVO, C., GRIVELL, S., GIEPMANS, B. N., COLLARD, J. G. & MOOLENAAR, W. H. 2003. Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem*, 278, 400-6.
- VAN MEETEREN, L. A. & MOOLENAAR, W. H. 2007. Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog Lipid Res*, 46, 145-60.
- XIE, Y., GIBBS, T. C., MUKHIN, Y. V. & MEIER, K. E. 2002. Role for 18:1 lysophosphatidic acid as an autocrine mediator in prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 277, 32516-26.
- XU, X. & PRESTWICH, G. D. 2010. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by a lysophosphatidic acid antagonist in an engineered three-dimensional lung cancer xenograft model. *Cancer*, 116, 1739-50.
- YAMADA, T., YANO, S., OGINO, H., IKUTA, K., KAKIUCHI, S., HANIBUCHI, M., KANEMATSU, T., TANIGUCHI, T., SEKIDO, Y. & SONE, S. 2008. Lysophosphatidic acid stimulates the proliferation and motility of malignant pleural mesothelioma cells through lysophosphatidic acid receptors, LPA1 and LPA2. *Cancer Sci*, 99, 1603-10.
- YANAGIDA, K., ISHII, S., HAMANO, F., NOGUCHI, K. & SHIMIZU, T. 2007. LPA4/p2y9/GPR23 mediates rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. *J Biol Chem*, 282, 5814-24.
- YANAGIDA, K., MASAGO, K., NAKANISHI, H., KIHARA, Y., HAMANO, F., TAJIMA, Y., TAGUCHI, R., SHIMIZU, T. & ISHII, S. 2009. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem*, 284, 17731-41.
- YANG, M., ZHONG, W. W., SRIVASTAVA, N., SLAVIN, A., YANG, J., HOEY, T. & AN, S. 2005. G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors stimulate proliferation of colon cancer cells through the  $\beta$ -catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 6027-32.
- YOSHIDA, K., NISHIDA, W., HAYASHI, K., OHKAWA, Y., OGAWA, A., AOKI, J., ARAI, H. & SOBUE, K. 2003. Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation*, 108, 1746-52.
- YU, S., MURPH, M. M., LU, Y., LIU, S., HALL, H. S., LIU, J., STEPHENS, C., FANG, X. & MILLS, G. B. 2008. Lysophosphatidic acid receptors determine

- tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 100, 1630-42.
- YUAN, X. B., JIN, M., XU, X., SONG, Y. Q., WU, C. P., POO, M. M. & DUAN, S. 2003. Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol*, 5, 38-45.
- YUN, C. C., SUN, H., WANG, D., RUSOVICI, R., CASTLEBERRY, A., HALL, R. A. & SHIM, H. 2005. LPA2 receptor mediates mitogenic signals in human colon cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289, C2-11.
- ZHANG, C., BAKER, D. L., YASUDA, S., MAKAROVA, N., BALAZS, L., JOHNSON, L. R., MARATHE, G. K., MCINTYRE, T. M., XU, Y., PRESTWICH, G. D., BYUN, H. S., BITTMAN, R. & TIGYI, G. 2004. Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation. *J Exp Med*, 199, 763-74.
- ZHENG, Y., KONG, Y. & GOETZL, E. J. 2001. Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane. *J Immunol*, 166, 2317-22.
- ZHENG, Y., VOICE, J. K., KONG, Y. & GOETZL, E. J. 2000. Altered expression and functional profile of lysophosphatidic acid receptors in mitogen-activated human blood T lymphocytes. *FASEB J*, 14, 2387-9.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

ATF-2	Activating transcription factor 2
ATX	Autotaxin
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CP	Schwellenwert (Crossing Point)
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPR	G-protein coupled receptor
GRO	Growth-regulated alpha protein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IL	Interleukin
LDL	Low density lipoprotein
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPP	Lipid phosphate phosphatases
MCP	Monocyte chemotactic protein
MMP	Matrix metalloproteinase
NFkB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NPP	Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
PL	Phospholipase
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure

Rock	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
STAT	Signal transducer and activator of transcription
uPA	Urokinase plasminogen activator
VEGF	Vascular endothelial growth factor

### **7.3 Danksagung**

Ganz herzlich möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Schumacher und meinem Betreuer Dr. Reinhard Müller für die Themenstellung, ihre stete Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und ganz besonders für den freundschaftlichen, motivierenden und offenen Umgang miteinander danken. Die durch sie ermöglichten Rahmenbedingungen haben die Grundlage für diese Doktorarbeit geschaffen und es war eine außergewöhnliche Erfahrung, als Mediziner in den Laboralltag integriert zu werden.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern Susanne Feldhaus und Renate Gehrke, die immer wieder bei Material- und Zeitengpässen aushelfen konnten, um das Unmögliche möglich zu machen. Mein Dank gilt auch meiner Mitbewohnerin Henriette Pflug und meiner besten Freundin Marie Jaeger für die richtige Mischung aus Druck und Motivation, die für einen zügigen Abschluss dieser Arbeit gesorgt haben. Besonderer Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern Dr. Ulrike Berliner und Dr. Peter Berliner, für die tatkräftige Unterstützung als Korrekturleser und Impulsgeber für Verbesserungen.

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

<b>Name</b>	Christoph Alexander Berliner
<b>Geburtsdatum</b>	20.07.1985
<b>Geburtsort</b>	Engelskirchen

### Ausbildung

---

10.2005 – 12.2011	<b>Universität Hamburg</b> , Hamburg  Studium der Humanmedizin  1. Staatsexamen 09/2007  Studienwahlfach: Radiologie und Nuklearmedizin  PJ-Wahlfach: Anästhesiologie  2. Staatsexamen 11/2011
07.2004 – 11.2004	<b>Städtisches Klinikum</b> , Gütersloh  Krankenpflegepraktikum
06.2005 – 09.2005	<b>DRK-Rettungsschule</b> , Münster  Rettungssanitäterausbildung
1995 – 2004	<b>Evangelisch-Stiftisches-Gymnasium</b> , Gütersloh
25.06.2004	Abitur

## PJ-Tertiale und Famulaturen

---

03.2011 – 07.2011	Universität Hamburg <b>Universitätsklinikum Eppendorf</b> , Hamburg Anästhesiologie und Intensivmedizin
12.2010 – 03.2011	Universität Hamburg <b>Asklepios Klinik St. Georg</b> , Hamburg Innere Medizin
10.2010 – 12.2010	Tel Aviv University <b>Chaim Sheba Medical Center</b> , Tel-Aviv Allgemeinchirurgie
08.2010 – 10.2010	National University of Singapore <b>Singapore General Hospital</b> , Singapur Unfallchirurgie
07.2009 – 08.2009	<b>Asklepios Klinik Wandsbek</b> , Hamburg Zentrale Medizinische Notaufnahme
11.2008 – 12.2008	<b>Asklepios Klinik Altona</b> , Hamburg Abteilung für Gastroenterologie
02.2008 - 04.2008	<b>Klinikum Itzehoe</b> , Itzehoe Abteilung für Unfallchirurgie
01.2008 – 02.2008	<b>Universitätsklinik Hôpital Gabriel Touré</b> , Bamako (Mali) Abteilung für Allgemeinchirurgie

## Veröffentlichungen

---

05.2010 MULLER, R., BERLINER, C., LEPTIN, J., PORTNER, D., BIALECKI, W., KLEUSER, B., SCHUMACHER, U. & MILICEVIC, N. M. 2010. Expression of sphingosine-1-phosphate receptors and lysophosphatidic acid receptors on cultured and xenografted human colon, breast, melanoma, and lung tumor cells. *Tumour Biol*, 31, 341-9.

## Sprachen

---

Deutsch: Muttersprache

Englisch: Fließend in Wort und Schrift

Französisch: 3 Jahre Unterricht

Latein: Latinum

## Sonstiges

---

Mitglied in der Studienstiftung des deutschen Volkes von 2007-2011

## **7.5 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....